Chromatographische Bestimmung von Salbengrundlagen und Emulgatoren des Arzneibuches

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Helga Langlouis
aus Ulm

1983

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543922_0069

Chromatographische Bestimmung von Salbengrundlagen und Emulgatoren des Arzneibuches

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Helga Langlouis
aus Ulm

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Februar 1983
Dekan: Professor Dr. J. Strähle
1. Berichterstatter: Professor Dr. K.-A. Kovar
2. Berichterstatter: Professor Dr. H.P.T. Ammon

Die vorliegende Arbeit wurde im Oktober 1979 unter Anleitung von Herrn Professor Dr.K.-A.Kovar am Teilbereich Pharmazie der Fakultät Chemie und Pharmazie begonnen und im September 1982 abgeschlossen.

Für die wertvollen Anregungen und die freundliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit danke ich Herrn Professor Dr.K.-A.Kovar sehr herzlich.

Gleichzeitig möchte ich dem ehemaligen Direktor des pharmazeutischen Institutes, Herrn Professor H.Auterhoff, für die Förderung der Arbeit sehr herzlich danken.

I. Einleitung

Nach §7 der Apothekenbetriebsordnung müssen Arzneimittel bevor sie in der Apotheke vorrätiggehalten, feilgehalten oder abgegeben werden, auf ihre einwandfreie Beschaffenheit geprüft werden. Dabei sollten im Arzneibuch aufgeführte Arzneimittel nach den Vorschriften des Arzneibuches geprüft werden. Sucht man nach Vorschriften zur Prüfung von Salbengrundlagen und Emulgatoren, so findet man im Arzneibuch nur allgemeine Bestimmungen, wie den Nachweis von Steroiden in der Wollwachsalkoholsalbe nach der Liebermann-Burchard-Reaktion oder die Bestimmung der Verseifungszahl, der Säurezahl und des Wassergehaltes in der Kühlsalbe. Da die Salbengrundlagen im allgemeinen aus aliphatischen Estern verschiedener Kettenlänge, aus Steroid-Estern und aus Kohlenwasserstoffen zusammengesetzt sind, eignen sich diese Methoden nicht zu einer genauen qualitativen und quantitativen Analyse.
Mit der Entwicklung chromatographischer Trennverfahren wurde versucht, diese auch in der Analytik der Fette, Wachse und Emulgatoren anzuwenden. In den letzten beiden Jahrzehnten erschienen mehrere Veröffentlichungen über die Anwendung der Dünnschichtchromatographie zur Trennung von Fettsäuren, von Derivaten derselben und von Triglyceriden. Es wurde auf silbernitrat- oder borathaltigen Kieselgelschichten und auf hydrophobierten Kieselgurschichten chromatographiert[1-6].

In den DGF-Einheitsmethoden wird seit 1978 die Gaschromatographie zur Analyse von Fettsäuren verwendet[7]. Dabei werden die freien oder gebundenen Fettsäuren in die entsprechenden Methyl- oder Propylester überführt. Die direkte gaschromatographische Trennung von Wachsestern ohne vorherige Hydrolyse gelang Streibl und Stránský[8].

Zunehmend gewinnt die Hochdruckflüssigkeitschromatographie an Bedeutung bei der Bestimmung von Lipiden. Sie wird z.B. bei der Triglyceridanalyse von natürlichen Fetten und Ölen in Kombination mit der Gaschromatographie angewendet[9].

Nach dem Arzneibuch werden Salben definiert als streichfähige Zubereitungen, die zur Anwendung durch Auftragen oder Einreiben bestimmt sind. Zur Rezeptur sollte Wollwachsalkoholsalbe verwendet werden, wenn nichts anderes angegeben ist.

Das Ziel dieser Arbeit war, einfache und geeignete analytische Methoden zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der Salbenzubereitungen und Emulgatoren des Arzneibuches zu entwickeln. Außerdem sollte ein Trennungsgang zur Isolierung von Arzneistoffen aus diesen Salbengrundlagen aufgestellt werden.

Folgende Salbengrundlagen bzw. -zubereitungen und Emulgatoren wurden in die Untersuchung einbezogen:

- Hydrophile Salbe
- Kühlsalbe

- Lanolin
- Polyethylenglykolsalbe
- Wollwachsalkoholsalbe
- Zinkpaste
- Zinksalbe
- Glycerolmonostearat
- PEG-Sorbitanfettsäureester
- PEG-400-stearat

II. Qualitative Bestimmung der Salbengrundlagen

Durch Bestimmung der Kennzahlen, wie Iodzahl, Säurezahl, Verseifungszahl usw. und mit Farb- oder Fällungsreaktionen kann man nur unvollständige Aussagen über die Zusammensetzung einer Salbengrundlage machen. Es wurde deshalb versucht, mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie die Salben zu analysieren.

Nach Kaufmann und Das[10] werden Wachse zuerst verseift und dann die Wachsalkohole und Wachssäuren chromatographiert. Die Säuren werden im Umkehrphasensystem auf mit Tetradecan imprägnierten Kieselgurplatten mit 90 proz. Essigsäure getrennt. Für die Alkohole werden paraffinimprägnierte Kieselgurplatten verwendet und 85 proz. Essigsäure als Fließmittel. Andere Literaturstellen beschreiben die Umesterung der Wachse mit Methanol und die anschließende Dünnschichtchromatographie der Fettsäuremethylester[11].

Die Fette, z.B. Erdnußöl, werden nach Wessels und Rajagopal[12] sowohl mit Hilfe der Umkehrphasen- als auch der Silbernitratchromatographie untersucht. Das Chromatogramm A der Abb.1 zeigt die Trennung der Triglyceride des Erdnußöls auf mit Silbernitrat imprägnierten Kieselgelplatten. Die einzelnen Fraktionen wurden eluiert und auf paraffinimprägnierten Kieselgurplatten entwickelt (s.Abb.1, Chromatogramm B).

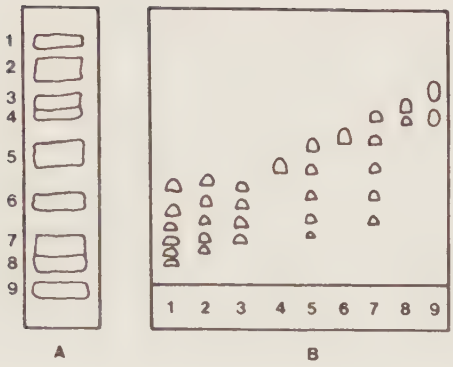


Abb.1: DC der Triglyceride des Erdnußöls[12)]

A: Trennung auf Silbernitratplatten

B: Trennung der aus A erhaltenen Fraktionen im Umkehrphasensystem

Es hat nicht an Versuchen gefehlt, Fette in Derivate zu überführen, die chromatographisch fraktioniert werden können. Mit Quecksilber(II)-acetat z.B. bilden die ungesättigten Säuren der Triglyceride sehr leicht Addukte, die man an Schichten aus Kieselgel und Kieselgur (30+70) trennen kann[13)].

Nach DAB 8 werden fette Öle durch Umkehrphasenchromatographie geprüft. Es werden Kieselgurplatten verwendet, die mit einer Mischung aus Petrolether und Paraffin imprägniert werden. Man trägt das in Chloroform gelöste Öl direkt auf und chromatographiert mit Eisessig über eine Laufstrecke von 12 cm. Das Chromatogramm von Erdnußöl, dem Hauptbestandteil der Kühlsalbe, ist in Abb.2 aufgezeichnet.

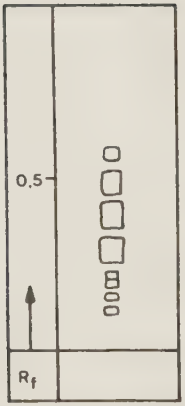


Abb.2: DC von Erdnußöl, hergestellt nach der Vorschrift des DAB 8 zur Identifizierung fetter Öle.

Der Nachteil dieser Methoden besteht darin, daß sie sehr arbeits- und zeitaufwendig sind. Außerdem können beim Reproduzieren viele Fehler gemacht werden, z.B. beim Herstellen der Schichten oder beim Imprägnieren.
Aufgrund dieser Schwierigkeiten wurde versucht, die Salbengrundlagen auf standardisierten Kieselgelplatten, den HPTLC-Kieselgelplatten (High Performance Thin Layer Chromatography-Platten) zu trennen.

Die Weiterentwicklung der Dünnschichtchromatographie hat gesteigerte Anforderungen an die Qualität der Sorptionsmittel und der aus ihnen hergestellten Schichten für die DC mit sich gebracht. Als Voraussetzung zur Herstellung von DC-Fertigschichten mit reproduzierbaren Trenneigenschaften war es zunächst erforderlich, eine Standardisierung der eingesetzten Sorptionsmaterialien zu erreichen. Dazu mußten die Zusammenhänge zwischen den physikalischen

und chemischen Eigenschaften der verwendeten Sorbentien auf der einen Seite und ihrem chromatographischen Verhalten andererseits erkannt werden.

Der chromatographische Prozeß spielt sich innerhalb des Porensystems des Sorptionsmittels ab, und zwar an der Oberfläche der Porenwandungen. Darum bestimmen die mittlere Porengröße, die Porengrößenverteilung, die spezifische Oberfläche und nicht zuletzt die chemische Zusammensetzung der Atomgruppierungen an der Oberfläche als Primärparameter die Trennung. Sekundär beeinflußen die mittlere Korngröße und die Korngrößenverteilung des Sorbens sowie die Packungsgüte der Schicht das chromatographische Geschehen[14-18].

Der Unterschied zwischen den DC- und HPTLC-Fertigschichten besteht nicht im Sorptionsmaterial. Es handelt sich in beiden Fällen um das gleiche Kieselgel. Allerdings besitzt das HPTLC-Material eine wesentlich engere Korngrößenverteilung und einen kleineren mittleren Korndurchmesser. Damit kann eine homogenere und dichtere Packungsstruktur in der Schicht erreicht werden. Dies wirkt sich positiv auf die Bodenhöhe und die Trennzeit aus.

Während bei den normalen DC-Fertigplatten Bodenhöhen von etwa 30 $/\mu m$ erzielt werden, kann man bei den HPTLC-Platten Bodenhöhen von 12 $/\mu m$ bei kurzer Laufstrecke erreichen. Da die Auflösung umgekehrt proportional zur Wurzel der Bodenhöhe $\sqrt{H}$ ist, bedeutet eine Verminderung der

Bodenhöhe eine Verbesserung der Auflösung.
Die Laufzeit beeinflußt die Entwicklungszeit nach der Gleichung $z^2 = k \cdot t$, d.h, daß geringere Laufstrecken eine erhebliche Verkürzung der Entwicklungszeit bewirken. Die Salbengrundlagen können auf den HPTLC-Platten auf einer Laufstrecke von 5 bis 8 cm getrennt werden. Man benutzt daher Platten mit einer Größe von 10 x 10 cm und wesentlich kleinere Entwicklungskammern. Anstatt 100 ml Fließmittel genügen 10 ml.
Die Auftragemengen liegen im Nanoliterbereich, während bei den herkömmlichen DC-Platten einige Mikroliter aufgetragen werden müssen.

Die "reversed phase" oder Umkehrphasenchromatographie spielt bei der Trennung der Salbengrundlagen eine wichtige Rolle. Man kann sie entweder der Adsorptions- oder der Verteilungschromatographie zuordnen. Die stationäre Phase ist weniger polar als die mobile Phase. Die am häufigsten verwendeten stationären Phasen bestehen aus Kieselgel, das an der Oberfläche kovalent mit Ethyl-, n-Octyl oder n-Octadecylgruppen gebunden ist.

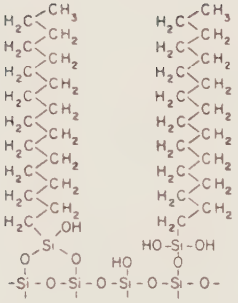


Abb.3: Kieselgeloberfläche mit kovalent gebundenen Octadecylgruppen

Zur Dünnschichtchromatographie der Salbengrundlagen wurden RP-8 und RP-18 HPTLC-Platten verwendet. Sie sind leichter vorzubereiten und leichter zu handhaben als die paraffinimprägnierten Platten, weil die Luftfeuchtigkeit die Aktivität der Schicht nicht beeinflußt. Substanzen werden von der "reversed phase"-Oberfläche um so stärker festgehalten, je unpolarer sie sind. Es gilt etwa die Reihe abnehmender Retentionen auf dem Sorbens: Alkane - Ether, Aldehyde, Ketone - Amine - Alkohole, Phenole - Carbonsäuren. Für polare Substanzen ist die Trennung an Kieselgel mit kurzen Alkylketten günstig, für apolare Substanzen eignet sich Kieselgel mit langen Alkylketten besser.

1. Lanolin

Lanolin besteht aus

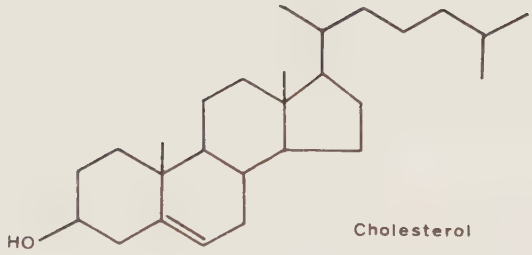
65 Teilen Wollwachs

15 Teilen dickflüssigem Paraffin

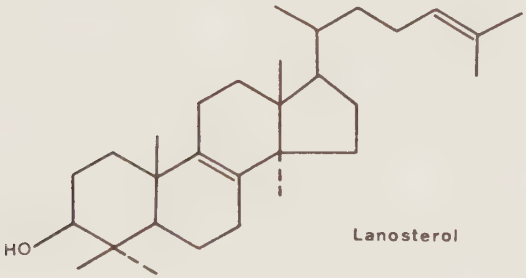
20 Teilen Wasser

Der wichtigste Bestandteil, das Wollwachs wird aus der Schafwolle gewonnen. Wollwachs ist chemisch gesehen ein typisches Wachs von komplexer Zusammensetzung[19]. Es besteht zu etwa 1 bis 2% aus Kohlenwasserstoffen und freien Säuren, zu etwa 3% aus freien Alkoholen und zu 95% aus Estern. Die Fraktion der veresterten Alkohole enthält 20% aliphatische Alkohole, 30% Cholestane (Cholesterin, 7-Ketocholesterin, Cholestan-3,5,6-triol), 27% Lanostane (Lanosterin, Dihydrolanosterin, Agnosterin, Dihydroagnosterin) sowie einen Rest noch nicht identifizierter Anteile.

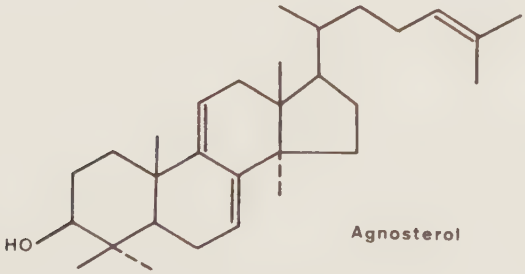
In der Säurefraktion findet man überwiegend C-9 bis C-29-Fettsäuren. Die Cholesterinester verleihen dem Wollwachs hydrophilen Charakter. Es kann 200 bis 300% Wasser in Form einer W/O-Emulsion aufnehmen.



Cholesterol



Lanosterol



Agnosterol

Das Arzneibuch charakterisiert Lanolin durch die Verseifungszahl, die Säurezahl und durch den Nachweis von Steroidestern nach Liebermann-Burchard mit Acetanhydrid und konzentrierter Schwefelsäure, wobei eine Grünfärbung auftritt[20].

Dünnschichtchromatographie von Lanolin

Lanolin wurde auf Kieselgelplatten mit dem Fließmittelgemisch Diethylether + Petrolether + Eisessig = 50 + 50 + 1 chromatographiert.

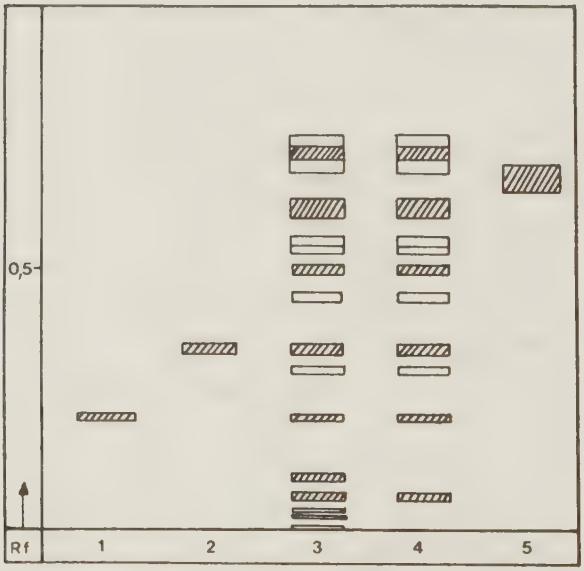


Abb.4: DC von Lanolin

Sorbens DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F_{254}

Fließmittel Diethylether + Petrolether + Eisessig= 50 + 50 + 1

Laufstrecke 15 cm, Laufzeit 30 min

Detektion 1. UV_{254} (schraffiert)

2.a) Antimon(III)-chlorid-Reagens; erhitzen bei 100°

b) UV_{366} (▬)

1=Cholesterol, 2=Lanosterol, 3=Wollwachs, 4=Lanolin, 5=Paraffin

Das Chromatogramm wurde zuerst im UV-Licht bei 254 nm betrachtet. Fluoreszenzlöschungen traten bei folgenden R_f-Werten auf: 0,07, 0,22, 0,31, 0,50, 0,61, 0,72. Bei dem R_f-Wert von 0,22 handelte es sich um Cholesterolester, bei R_f= 0,31 um Lanosterolester.
Nachdem die DC-Platte mit Antimon(III)-chlorid besprüht und kurz bei 100° erhitzt wurde, ergaben die Steroidester des im Lanolin enthaltenen Wollwachses verschiedene Färbungen, die sich im Laufe von 15 Minuten veränderten. Der Cholesterolester mit R_f= 0,22 färbte sich zuerst rot und wurde dann violett. Der Lanosterolester mit R_f= 0,31 hatte eine gelbe Farbe, die innerhalb kurzer Zeit nach braun umgeschlagen hat. Die R_f-Werte weiterer Steroidester und ihre Färbungen sind in Tab.4 aufgeführt. Einige Steroidester, die sich mit Antimon(III)-chlorid nur schwach färbten, fluoreszierten deutlich, wenn man die besprühte Platte im UV-Licht bei 366 nm betrachtet hat.

Auf HPTLC-Platten konnte Lanolin in kurzer Zeit chromatographiert werden. Bei einer Laufstrecke von 7 cm dauerte die Entwicklung 10 Minuten gegenüber 30 Minuten bei den normalen Kieselgelplatten. Es wurde wieder das Fließmittelgemisch Diethylether + Petrolether + Eisessig = 50 + 50 + 1 verwendet. Da die Platte nur 10 x 10 cm groß ist, genügten 10 ml Fließmittel.

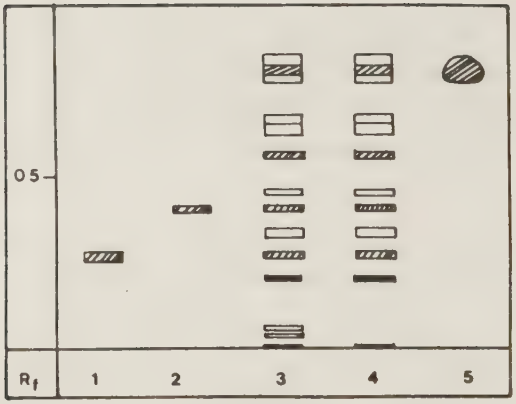


Abb.5: HPTLC von Lanolin

Sorbens HPTLC-Kieselgelplatten 60 F_{254}

Fließmittel Diethylether + Petrolether + Eisessig= 5 + 5 + 1

Laufstrecke 7 cm, Laufzeit 10 min

Detektion siehe Abb.4

1 = Cholesterol 2 = Lanolin 3 = Wollwachs

4 = Lanolin 5 = Paraffin

Die Steroidester wurden in gleicher Weise wie auf den herkömmlichen Kieselgelplatten getrennt (vgl. Abb.5). Die Umrisse der mit Antimon(III)-chlorid verschieden gefärbten Flecke waren auf den HPTLC-Platten deutlicher zu erkennen. Im UV-Licht bei 366 nm konnte auf dem Hochleistungsdünnschichtchromatogramm ein weiterer Steroidester mit R_f = 0,34 detektiert werden.

2. Wollwachsalkoholsalbe

Die Wollwachsalkoholsalbe wird hergestellt aus

6 Teilen Wollwachsalkohol
0,5 Teilen Cetylstearylalkohol
93,5 Teilen Vaseline

Die Wollwachsalkohole werden gewonnen durch alkalische Verseifung von Wollwachs und Extraktion mit einem organischen Lösungsmittel. Die Zusammensetzung entspricht deshalb der bei Lanolin beschriebenen Alkoholfraktion von Wollwachs.

Das DAB 8 identifiziert die Wollwachsalkoholsalbe durch die Erstarrungstemperatur am rotierenden Thermometer (38 bis 56°) und durch den Steroidnachweis nach Liebermann-Burchard.

Dünnschichtchromatographie der Wollwachsalkoholsalbe

Die Wollwachsalkoholsalbe wurde wie Lanolin auf Kieselgelplatten mit dem Fließmittelgemisch Diethylether + Petrolether + Eisessig = 50 + 50 + 1 chromatographiert. Die Trennung der in der Wollwachsalkoholsalbe enthaltenen Wollwachsalkohole zeigt Abb.6.

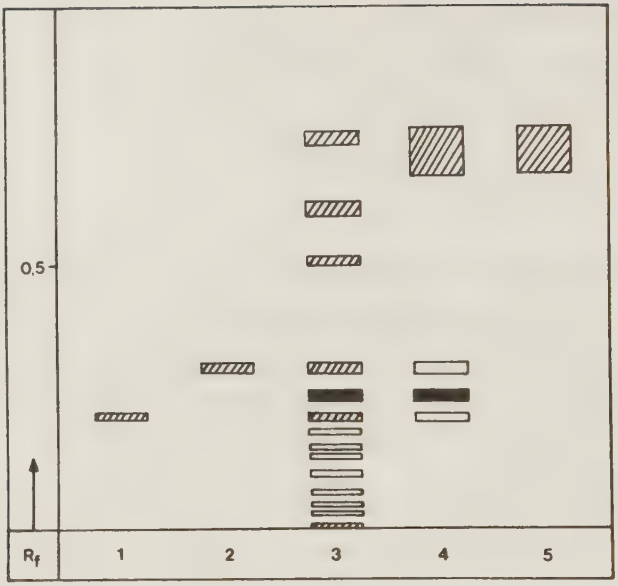


Abb.6: DC der Wollwachsalkoholsalbe

Sorbens DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F_{254}

Fließmittel Diethylether + Petrolether + Eisessig= 50 + 50 + 1

Laufstrecke 15 cm Laufzeit 30 min

Detektion siehe Abb.4

1 = Cholesterol 2 = Lanosterol 3 = Wollwachsalkohole 4 = Wollwachsalkoholsalbe 5 = Vaseline

Die Detektion erfolgte zuerst im UV-Licht bei 254 nm. Eine schwache Fluoreszenzlöschung war an der Startlinie und bei einem R_f-Wert von 0,70 zu erkennen. Bei der Substanz mit R_f = 0,70 handelte es sich um Vaseline.

Die schwache Lichtabsorption wurde verursacht von geringen Mengen an aromatischen Kohlenwasserstoffen, die als Verunreinigung in der Vaseline enthalten sind. Da die Konzentration der Wollwachsalkohole in der Salbe nur 6% beträgt, konnte man beim Auftragen einer 1 proz. Lösung der Salbe keine Fluoreszenzlöschung der Steroide sehen. Bei den Wollwachsalkoholen, die als Vergleich aufgetragen wurden (1 proz.), traten Fluoreszenzlöschungen bei folgenden R_f-Werten auf: 0,07, 0,14, 0,18, 0,22, 0,31, 0,51. Bei R_f= 0,22 handelte es sich um Cholesterol, bei R_f= 0,31 um Lanosterol.

Für geringe Steroidkonzentrationen wie in der Wollwachsalkoholsalbe ist Antimon(III)-chlorid ein empfindliches Nachweisreagenz. Nach Besprühen und Erhitzen der DC-Platte bei 100° wurde Cholesterol mit orangeroter Farbe sichtbar, die sich innerhalb von 15 Minuten nach blauviolett veränderte. Lanosterol zeigte eine gelbbraune Farbe, die innerhalb kurzer Zeit nach Graubraun umschlägt. Die besprühte Platte wurde im UV-Licht bei 366 nm betrachtet. Bei einem R_f-Wert von 0,26 konnte ein weiteres Steroid festgestellt werden.

Der Cetylstearylalkohol, der nur zu 0,5 % in der Salbe enthalten ist, konnte mit den drei durchgeführten Detektionsmöglichkeiten nicht erkannt werden.

Die Wollwachsalkohole wurden auch auf HPTLC-Kieselgelplatten chromatographiert. Auf einer Laufstrecke von nur 7 cm trennten sich die Steroide. Detektiert wurde wieder

zuerst im UV-Licht bei 254 nm, dann durch Besprühen mit Antimon(III)-chlorid. Gegenüber den normalen Kieselgelplatten konnte bei einem R_f-Wert von 0,19 ein weiteres Steroid detektiert werden (Abb.7).

Abb.7: HPTLC der Wollwachsalkoholsalbe

Sorbens HPTLC-Kieselgelplatten 60 F_{254}

Fließmittel Diethylether + Petrolether + Eisessig= 5 + 5 + 0,1

Laufstrecke 7 cm, Laufzeit 10 min

1 = Cholesterol

2 = Lanosterol

3 = Wollwachsalkohole

4 = Wollwachsalkoholsalbe

5 = Vaseline

Detektion siehe Abb.4

3. Hydrophile Salbe

Die Hydrophile Salbe wird hergestellt aus

30 Teilen Emulgierendem Cetylstearylalkohol

35 Teilen dickflüssigem Paraffin

35 Teilen Vaselin

Der Emulgierende Cetylstearylalkohol,besteht aus 88% Cetylstearylalkohol und 7% cetylstearylschwefelsaurem Natrium. Er gehört zu den Komplexemulgatoren, weil er aus einem W/O-Emulgator (Cetylstearylalkohol) und einem O/W-Emulgator (cetylstearylschwefelsaures Natrium) besteht. Die Hydrophile Salbe gilt deshalb als "Komplexemulgatorsalbe"[21]. Sie kann größere Mengen Wasser binden. In Wasser gelöste Arzneisubstanzen können leicht eingearbeitet werden und liegen in der fertigen Salbenemulsion in echter Lösung vor.

Das DAB 8 charakterisiert die Hydrophile Salbe durch die Hydroxylzahl (55 - 70) und durch den Sulfat-Nachweis aus dem emulgierenden Cetylstearylalkohol. Dabei wird die Salbe mit Ethanol zum Sieden erhitzt und filtriert. Das Filtrat wird eingedampft und der Rückstand mit Wasser und verdünnter Salzsäure aufgenommen. Mit Bariumchlorid-Lösung bildet sich ein weißer Niederschlag.

Dünnschichtchromatographie der Hydrophilen Salbe

Zur Chromatographie der Hydrophilen Salbe auf Kieselgelplatten wurde das Fließmittelgemisch Trichlorethylen + Chloroform = 3 + 2 verwendet.

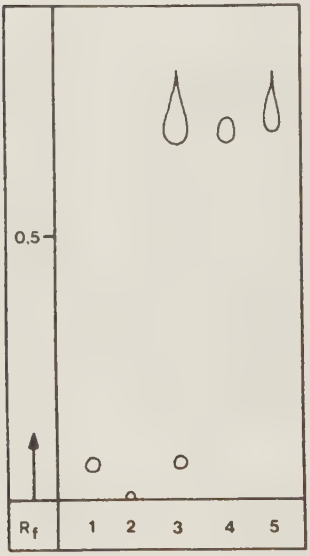


Abb.8: DC der Hydrophilen Salbe

Sorbens DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F_{254}

Fließmittel Trichlorethylen + Chloroform = 3 + 2

Laufstrecke 15 cm, Laufzeit 35 min.

1 = Cetylstearylalkohol

2 = Cetylstearylschwefelsaures Natrium

3 = Hydrophile Salbe

4 = Paraffin

5 = Vaseline

Detektion Molybdatophosphorsäure-Reagens, Erhitzen bei 100

Im UV-Licht bei 254 nm war auf dem Chromatogramm ein großer Fleck mit einem R_f-Wert von 0,71 zu erkennen. Es handelte sich um Paraffin und Vaseline, die nicht getrennt wurden.

Man besprühte die DC-Platte mit einer Lösung von Molybdatophosphorsäure in Ethanol und erhitzte 10 Minuten bei 100°. Der Cetylstearylalkohol wurde als blauer Fleck auf der gelb gefärbten Platte sichtbar. Der R_f-Wert betrug 0,06. Das cetylstearylschwefelsaure Natrium war als blauer Punkt an der Startlinie zu erkennen.

Durch "reversed phase"-Chromatographie konnte der Cetylstearylalkohol in seine Komponenten zerlegt werden. Es wurden RP-18-Kieselgelplatten und Methanol als Fließmittel verwendet. Mit Molybdatophosphorsäure wurde detektiert. Nach Erhitzen der besprühten Platte bei 100° zeigten sich die beiden Alkohole als helle Flecken auf blauem Untergrund. Bei längerem Erhitzen färbten sie sich dunkelblau. Der Cetylalkohol hatte einen R_f-Wert von 0,33, der R_f-Wert vom Stearylalkohol war 0,26. Das Vaselin und das cetylstearylschwefelsaure Natrium blieben auch bei RP-18-HPTLC-Platten an der Startlinie. Beim Paraffin war ein kurzes Aufsteigen im Sorbens angedeutet.

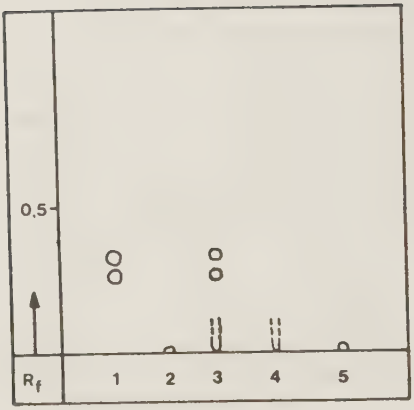


Abb.9: RP-DC der Hydrophilen Salbe

Sorbens RP-18-HPTLC-Kieselgelplatten

Fließmittel Methanol

Laufstrecke 6 cm, Laufzeit 15 min

1 = Cetylstearylalkohol

2 = Cetylstearylschwefelsaures Natrium

3 = Hydrophile Salbe

4 = Paraffin

5 = Vaseline

Detektion siehe Abb.7

4. Kühlsalbe

Die Kühlsalbe ist zusammengesetzt aus

7 Teilen gelbem Wachs
8 Teilen Walrat
60 Teilen Erdnußöl
25 Teilen Wasser

Das gelbe Wachs (Bienenwachs) besteht zu 70% aus Myricin, einem komplexen Estergemisch[22]. Vorwiegend C-26-, C-28-, C-30- und C-32-Alkohole sind mit C-16- und C-26-Fettsäuren verestert. Außerdem findet man etwa 14 % freie Wachssäuren, 12 % Kohlenwasserstoffe sowie je 1 % Steroidester und freie Wachsalkohole.

Walrat ist ebenfalls ein Estergemisch[5]. Die gaschromatographische Auftrennung zeigt, daß Ester bis zu maximal 40 C-Atomen vorkommen. Als Hauptkomponenten erwiesen sich die geradzahligen C-28-, C-30-, C-32-, C-34- und C-36-Ester.
Erdnußöl besteht aus Triglyceriden. Der Anteil der ungesättigten, veresterten Fettsäuren wie Ölsäure und Linolsäure ist sehr hoch.

Die Identitätsprüfung nach DAB 8 beruht auf dem Nachweis der veresterten Arachinsäure und Lignocerinsäure. Man verseift das Erdnußöl, säuert an und bestimmt den Beginn der Kristallisation der beiden Fettsäuren in Ethanol.

$H_3C-(CH_2)_{18}-COOH$ Arachinsäure

$H_3C-(CH_2)_{22}-COOH$ Lignocerinsäure

Dünnschichtchromatographie der Kühlsalbe

Gelbes Wachs wurde nach Kaufmann und Das[23] mit dem Fließmittel Trichlorethylen + Chloroform = 3 + 1 chromatographiert. Die Kühlsalbe konnte durch Abändern der Anteile der beiden Fließmittelkomponenten in 3 + 2 in seine Bestandteile getrennt werden.

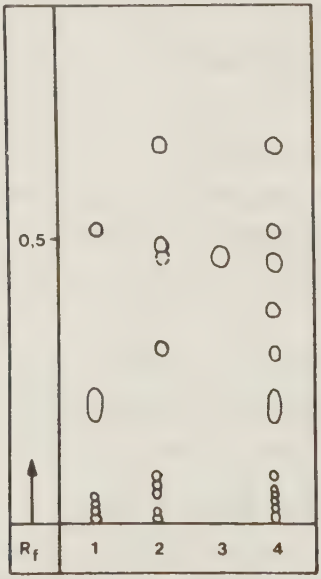


Abb.10: DC der Kühlsalbe
Sorbens DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F_{254}
Fließmittel Trichlorethylen + Chloroform = 3 + 2
Laufstrecke 15 cm, Laufzeit 35 min
1 = Erdnußöl 3 = Walrat
2 = Gelbes Wachs 4 = Kühlsalbe
Detektion siehe Abb.8

Das Chromatogramm wurde zuerst im UV-Licht bei 254 nm betrachtet. Fluoreszenzlöschungen traten auf beim Erdnußöl, beim gelben Wachs nur schwach.
Die komplexe Zusammensetzung der Kühlsalbe bzw. seiner Bestandteile wurden sichtbar, als man die Platte mit Molybdatophosphorsäure besprühte und 10 Minuten bei 100° erhitzte. Bei der Kühlsalbe und bei den Vergleichssubstanzen zeigten sich mehrere blaue Flecke. Die Substanzen mit den R_f-Werten 0,22 und 0,56 konnten eindeutig dem Erdnußöl zugeordnet werden. Die Flecken mit R_f= 0,33 und 0,72 wurden von Estern aus dem gelben Wachs verursacht. Die Ester mit den R_f-Werten zwischen 0,01 und 0,06 gehörten entweder zum Erdnußöl oder zum gelben Wachs. Walrat hatte einen R_f-Wert von 0,50. Es wurde zuerst als heller Fleck sichtbar, der innerhalb von 30 Minuten blau wurde.

Auf RP-18-HPTLC-Platten konnten die Triglyceride des Erdnußöls mit dem Fließmittelgemisch Ethylacetat + Ethanol + Methanol = 4 + 3 + 3 getrennt werden. Die Detektion erfolgte mit Molybdatophosphorsäure. Die Ester vom Walrat und vom gelben Wachs wurden unter diesen Bedingungen nicht getrennt.

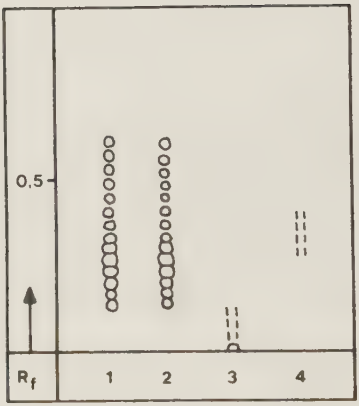


Abb.11: RP-DC der Kühlsalbe

Sorbens RP-18-HPTLC-Kieselgelplatten

Fließmittel Ethylacetat + Ethanol + Methanol =

4 + 3 + 3

Laufstrecke 8 cm, Laufzeit 25 min

1 = Erdnußöl

2 = Kühlsalbe

3 = Gelbes Wachs

4 = Walrat

Detektion siehe Abb.8

5. Polyethylenglykol-Salbe

Die Bestandteile der Polyethylenglykol-Salbe sind

1 Teil Polyethylenglykol 300

1 Teil Polyethylenglykol 1500

Polyethylenglykole sind chemisch gesehen Polykondensationsprodukte des Ethylenglykols oder Polymerisationsprodukte des Ethylenoxids. Sie werden durch das mittlere Molekulargewicht gekennzeichnet. Die Polyethylenglykole 200, 300, 400 und 600 sind flüssig, PEG 1000 ist salbenartig[24]. Die PEGe 4000 bis 6000 sind feste Stoffe. Durch die endständigen Hydroxylgruppen und die Ethersauerstoffatome besitzen PEGe hydrophile Eigenschaften. Die PEGe 200 bis 6000 werden in der Pharmazie als Lösungsvermittler für viele Arznei- und Hilfsstoffe verwendet. Aufgrund von Unverträglichkeiten können allerdings viele Substanzen nicht mit PEGen verarbeitet werden. Es treten Verfärbungen auf mit Sulfonamiden, Quecksilberoxid, Theophyllinderivaten, Gerbsäuren, Aminophenazon u.a. Niederschläge zeigen sich z.B. mit Acetylsalicylsäure und Phenolen.
Penicilline werden schnell inaktiviert. Verschiedene Kunststoffe werden von Polyethylenglykolen gelöst.

Die PEGe werden nach DAB 8 durch die Erstarrungstemperatur, die Viskosität und die Hydroxylzahl charakterisiert. Aus der Hydroxylzahl kann die mittlere Molmasse

berechnet werden

$$\text{Molmasse} = \frac{56\,110 \times 2}{\text{Hydroxylzahl}}$$

Bei der Identitätsprüfung nach DAB 8 werden die Polyethylenglykole mit konzentrierter Schwefelsäure erhitzt, wobei 1,4-Dioxan entsteht, das mit Quecksilber(II)-chlorid einen schwerlöslichen Anlagerungskomplex bildet[25].

Dünnschichtchromatographie der Polyethylenglykol-Salbe

Für die Dünnschichtchromatographie der Polyethylenglykol-Salbe wurde das Fließmittelgemisch, das Ullmann[26] für Polyethylenglykolderivate verwendete, abgeändert. Man chromatographierte auf Kieselgelplatten mit dem Fließmittel Methanol + Chloroform + Wasser = 60 + 32 + 8.

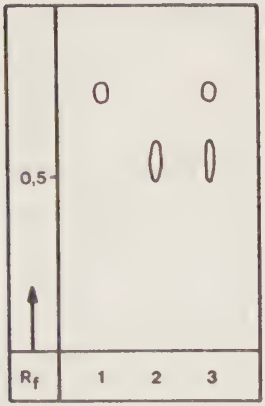


Abb.12: DC der PEG-Salbe

Sorbens DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F_{254}

Fließmittel Methanol + Chloroform + Wasser = 60 + 32 + 8

Laufstrecke 10 cm, Laufzeit 80 min

1 = PEG 300

2 = PEG 1500

3 = PEG-Salbe

Detektion modifiziertes Dragendorffs Reagens

Die Detektion erfolgte durch Besprühen mit modifiziertem Dragendorffs Reagens[27]. Nach kurzem Erhitzen bei 100° konnte man erkennen, daß die PEG-Salbe in die beiden Bestandteile PEG 300 und PEG 1500 getrennt wurde. Sie färbten sich orangerot.

Auf HPTLC-Platten dauerte die Entwicklung des Chromatogramms über eine Laufstrecke von 6 cm nur 35 Minuten.

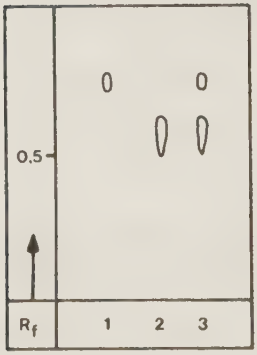


Abb.13: HPTLC der Polyethylenglykol-Salbe

Sorbens HPTLC-Kieselgelplatten 60 F_{254}

Fließmittel Methanol+Chloroform+Wasser =

6,0 + 3,2 + 0,8

Laufstrecke 6 cm, Laufzeit 35 min

1 = PEG 300

2 = PEG 1500

3 = PEG-Salbe

Detektion siehe Abb.12

6. Zinkpaste

Die Zinkpaste ist aus folgenden Bestandteilen zusammengesetzt

25 Teile Zinkoxid

25 Teile Weizenstärke

50 Teile Vaselin

Die Identitätsprüfung nach DAB 8 beruht auf dem Nachweis von Zink und Weizenstärke. Durch Erwärmen der Paste mit Schwefelsäure und Abfiltrieren des Vaselins erhält man eine wäßrige Lösung von Zinksulfat, mit der die Identitätsreaktionen der Ph.Eur. auf Zink durchgeführt werden. Es wird mit Kaliumhexacyanoferrat(II) als $K_2Zn_3[Fe(CN)_6]_2$ gefällt und mit Natronlauge als $Zn(OH)_2$, das nach weiterem Zusatz als Hydroxokomplex $[Zn(OH)_2]^{2-}$ wieder in Lösung geht. Die Weizenstärke wird mikroskopisch nachgewiesen.

7. Zinksalbe

Die Zinksalbe wird hergestellt aus

1 Teil Zinkoxid

9 Teilen Wollwachsalkoholsalbe

Nach DAB 8 wird das Zink wie bei der Zinkpaste beschrieben nachgewiesen. Die Wollwachsalkoholsalbe wird durch die Liebermann-Burchard-Reaktion identifiziert.

Dünnschichtchromatographie der Zinksalbe

Bevor die Zinksalbe chromatographiert werden konnte, mußte das Zinkoxid abgetrennt werden. Dazu wurde die Salbe in Chloroform suspendiert und das nicht gelöste Zinkoxid durch Zentrifugieren entfernt. Von der klaren Lösung wurden 5 µl auf die DC-Platte aufgetragen und unter den bei der Wollwachsalkoholsalbe beschriebenen Bedingungen chromatographiert.

III. Quantitative Bestimmung von Salbengrundlagen

Die qualitative Zusammensetzung einer Salbe kann durch Dünnschichtchromatographie und durch allgemeine Nachweisreaktionen innerhalb kurzer Zeit und ohne großen Aufwand ermittelt werden. Für eine quantitative Bestimmung durch Dünnschichtchromatographie kämen für Salbengrundlagen zwei Möglichkeiten in Frage, entweder die direkte Messung der Chromatogrammflecken mit einem Spektraldensitometer oder die Bestimmung nach Extraktion aus der Sorptionsschicht.

Das Spektraldensitometer ist im Prinzip wie ein Spektralphotometer gebaut. Der Lichtstrahl trifft senkrecht auf die DC-Platte bzw. die Probenflecke. Der nicht absorbierte Strahlungsanteil wird reflektiert und gelangt zum Empfänger. Man mißt also die Remissionsminderung des eingestrahlten Lichts durch Absorption im sichtbaren oder ultravioletten Bereich. Eine lineare Abhängigkeit der Lichtabsorption von der aufgebrachten Substanzmenge erhält man nur, wenn die Lichtdurchlässigkeit sehr hoch ist, die Fleckenfläche nicht zu klein und die Fleckendeformation gering ist. Außerdem steigen die Flächen der Densitometerkurven für die gleiche Menge einer aufgetragenen Substanz zwischen R_f= 0,0 bis 0,3 steil an, durchlaufen zwischen 0,4 und 0,7 ein je nach Absolutmenge mehr oder weniger gut geprägtes Plateau, um anschließend weiterzusteigen[28)]. Die Nachweisgrenze für Remissionsmessungen liegt bei 10^{-8}g Substanz.

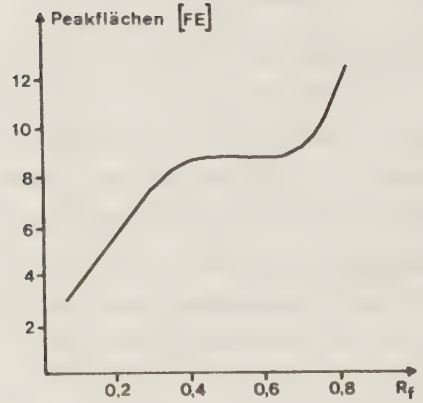


Abb.14: Abhängigkeit der Fleckgröße vom R_f-Wert

Neben Remissionsmessungen sind auch Transmissionsmessungen möglich[29]. Für die quantitative DC-Auswertung eignen sie sich aber weniger, da die Sorptionsschicht eine große Lichtstreuung verursacht und die Trägermaterialien (Glasplatten oder Kunststoff) für UV-Licht nicht durchlässig sind.

Bei der Extraktionsmethode werden die Substanzen zunächst dünnschichtchromatographisch getrennt, mit einer geeigneten Methode nachgewiesen, aus der Sorptionsschicht extrahiert und absorptionsphotometrisch oder fluorimetrisch gemessen. Dieses Verfahren verursacht einen großen Arbeits- und Zeitaufwand. Es wird durch die vielen Arbeitsgänge störanfällig. Die Fehlergrenze liegt bei 3%.

Man stellt also fest, daß eine quantitative DC-Auswertung einen ziemlich großen Aufwand erfordert und daß die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit zu wünschen übrig läßt.

Für quantitative Bestimmungen eignet sich die Hochdruck-flüssigkeitschromatographie besser. Es gibt zwei Möglichkeiten, den Peak einer Substanz quantitativ auszuwerten. Dies sind die Auswertung der Peakflächen oder der Peakhöhen[30]. Bei einem gut aufgelösten Peak sind beide Methoden anwendbar und gewährleisten bei Verwendung eines linearen Detektors über einen größeren Konzentrationsbereich Proportionalität. Die Höhe eines Peaks ist in einem Chromatogramm stark von der Retentionszeit abhängig. Wegen dieser Abhängigkeit dürfen keine starken Schwankungen der Retention auftreten. Im Gegensatz zur Flächenauswertung spielen aber Flußschwankungen bei der Höhenmeßmethode keine Rolle.

In der Flüssigkeitschromatographie ist das Detektorsignal viel stärker von speziellen Stoffeigenschaften abhängig als in der Gaschromatographie. So ist beispielsweise das UV-Signal von der Stoffeigenschaft "Extinktionskoeffizient" abhängig. Beim RI-Detektor ist das Signal von der Differenz der Brechnungsindices der Probe und des Elutionsmittels abhängig. Deshalb muß für jede quantitative Analyse mindestens ein Eichchromatogramm ausgeführt werden, welches alle interessierenden Komponenten des Probegemisches in ungefähr derselben Konzentration (externer Standard) enthält, Die Menge X des zu bestimmenden Stoffes berechnet sich zu

$$X = \frac{\text{Signal von X} \cdot \text{Menge Eichsubstanz}}{\text{Signal der Eichsubstanz}}$$

Das Eichchromatogramm sollte bei jeder quantitativen Bestimmung neu aufgenommen werden. Greift man auf ein früher registriertes Chromatogramm zurück, so können sich durch eingetretene Änderungen der chromatographischen Bedingungen Fehler einschleichen. Für hohe Genauigkeit muß eine Eichkurve mit mindestens drei Meßpunkten aufgenommen werden.

Beim Verfahren des externen Standards ist die Dosierung sehr kritisch. Das Dosiervolumen muß genau bekannt und reproduzierbar sein, so daß nur Schlaufeninjektion in Frage kommt. Fügt man der Probe und der Eichmischung eine weitere Komponente, d.h. einen "internen Standard" zu, so spielen kleine Abweichungen im Dosiervolumen keine Rolle mehr. Man bestimmt dazu das Peakhöhen- oder Peakflächenverhältnis interner Standard zu Komponente X. Mit Hilfe einer Eichkurve, die das Signalverhältnis von internem Standard zu X in Abhängigkeit des Mischungsverhältnisses darstellt, ist der Anteil von X in der Probe berechenbar.

Um ein geeignetes System für die Trennung der Salbengrundlagen durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie zu finden, wurde versucht, die Bedingungen der Dünnschichtchromatographie auf die Säulenchromatographie zu übertragen. In der Literatur findet man genug "Übertragungsformeln"[31,32]; doch lassen schon ihre Zahl und unterschiedliche Aussagen darauf schließen, daß man dieses Gebiet nur ungenügend beherrscht und viele unerwartete Zufallsergebnisse wie auch enttäuschende Mißerfolge scheinen zu zeigen, daß die Regel hier eher die Ausnahme ist.

Allgemein kann man sagen, daß die Chromatographie in der trockenen Säule in allen wesentlichen Merkmalen der DC-Entwicklung in der ungesättigten S-Kammer entspricht und zwar für Einkomponenten-Fließmittel wie für Fließmittelgemische. Fließmittelgemische werden nämlich in der S-Kammer wie in der trockenen Säule in der gleichen Weise unter Ausbildung von Mehrfachfronten entmischt. Da bei Einkomponentenfließmitteln kein Selektivitätsunterschied zwischen Trennungen in S- und N-Kammern besteht, ist auch eine DC ⟶SC-Übertragung bei Entwicklung in N-Kammern möglich. Bei Mehrkomponentenfließmitteln sind die Verhältnisse etwas komplizierter, da in der N-Kammer die Vorbeladung mit Fließmittelgemischen meist sehr unterschiedlicher Stärke eine mehr oder weniger starke Desaktivierung der Schicht über die Gasphase bewirkt. Die Trennung in der N-Kammer kann also keineswegs auf die trockene Säule übertragen werden. Sie kann jedoch auf die nasse Säule übertragen werden, wenn Kieselgel 60 (Merck) als Sorptionsmittel verwendet wird. Bei der "reversed phase"-Chromatographie von Salbengrundlagen ist weder von der S- noch von der N-Kammer eine Übertragung von der Dünnschichtchromatographie auf die Hochdruckflüssigkeitschromatographie möglich.

1. Quantitative Bestimmung von Wollwachs in Lanolin

Dünnschichtchromatographisch wurde mit Kieselgel als Sorbens und Hexan-Diethylether-Eisessig als Fließmittelgemisch eine gute Trennung der Steroid-Ester erzielt. Mit dem gleichen Sorbens und der gleichen Zusammensetzung des Fließmittels wurde versucht, eine Trennung durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie zu erreichen. Die Detektion erfolgte mit einem RI-Detektor. Er registriert alle Substanzen, die einen anderen Brechungsindex aufweisen als die reine mobile Phase.

Abb.15: HPLC von Lanolin

Fließmittel Hexan
+ Diethylether
+ Eisessig =
50 + 50 + 1
LiChrosorb^{R} Si 60,7 µm
Säule 250 mm lang, ø 4,0 mm
Durchfluß 0,90 ml/min

Peak 1: Cholesterolester
Peak 2: Lanosterolester
Detektion: RI-Detektor

Der Peak des Cholesterolesters eignete sich am besten zur quantitativen Bestimmung (vgl. Abb.15). Er war charakterisiert durch die Retentionszeit von 9,55 Minuten. Da die Auflösung zu den benachbarten Peaks größer als 1,5 war, konnte eine Flächenbestimmung durchgeführt werden.

Eichgerade zur Bestimmung von Wollwachs im Lanolin

Über eine Rheodyne Schleife mit 20 µl wurden Wollwachslösungen verschiedener Konzentration in jeweils 10 g Diethylether auf die Säule gegeben. Der Integrator berechnete die Fläche der Cholesterolesterpeaks. Sie wurden in einer Tabelle zusammengefaßt und danach die Eichgerade bestimmt. Die Eichgerade wurde nach der Formel für die lineare Regression y= a + bx berechnet.

$$a = \left[\frac{\sum y_i}{n} - b \frac{\sum x_i}{n} \right]$$

$$b = \frac{\sum x_i y_i - \frac{\sum x_i y_i}{n}}{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}}$$

Außerdem wurde das Bestimmtheitsmaß r^2 bestimmt.

Für das Bestimmtheitsmaß gilt

$$r^2 = \frac{\left[\sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{n} \right]^2}{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n} \quad \sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{n}}$$

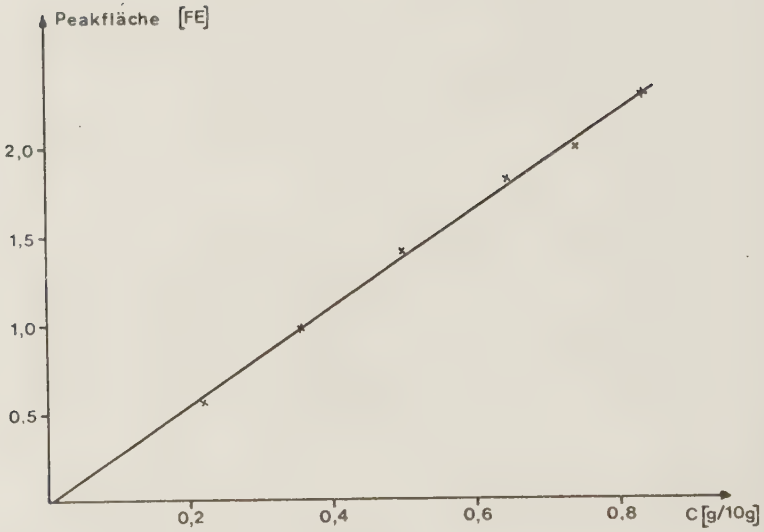


Abb.16: Eichgerade zur Bestimmung von Wollwachs in Lanolin

Für die Eichgerade und das Bestimmtheitsmaß wurden folgende Werte berechnet

$$y = -0{,}018 + 2{,}756\ x \quad \text{und} \quad r^2 = 0{,}998$$

Mit der Eichgerade wurde der Gehalt an Wollwachs in Lanolin ermittelt. Nach der Vorschrift des Arzneibuches sollte er 65% betragen.
Bei der Überprüfung von Lanolin aus verschiedenen Apotheken auf den Gehalt an Wollwachs war die Abweichung vom vorgeschriebenen Wert jeweils sehr gering. Sie betrug 0,23%, 0,60%, 0,79% und 0,88%.

2. Quantitative Bestimmung der Wollwachsalkohole in der Wollwachsalkoholsalbe

Wie beim Lanolin wurde zunächst versucht, mit Kieselgel als Sorbens und einem Hexan-Ether-Eisessig-Gemisch als Elutionsmittel eine Auftrennung der Steroide zu erhalten.

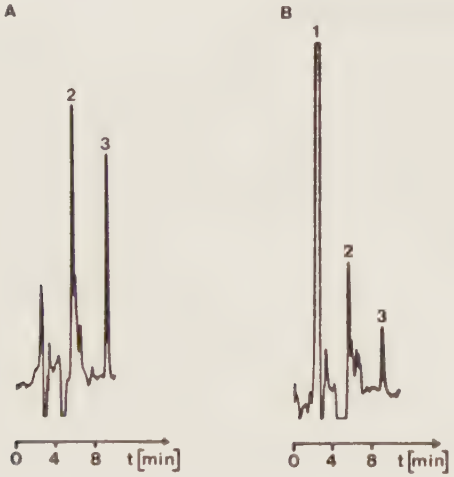


Abb.17: A: HPLC der Wollwachsalkohole
B: HPLC der Wollwachsalkoholsalbe

Fließmittel: Hexan + Diethylether + Eisessig = 50+50+1
LiChrosorb^{R} Si 60 7 µm
Säule 250 mm lang, ø 4,0 mm
Durchfluß 0,90 ml/min

Peak 1: Vaseline
Peak 2: Lanosterol
Peak 3: Cholesterol
Detektion: RI-Detektor

Im Chromatogramm der Wollwachsalkohole und der Wollwachsalkoholsalbe sind die bedeutendsten Steroide der Salbe, nämlich das Lanosterol und das Cholesterol deutlich zu erkennen. Da der Cholesterolpeak besser aufgelöst ist, eignet er sich zur Flächenbestimmung für die Ermittlung des Gehaltes an Wollwachsalkoholen in der Salbe.

Eichgerade der Wollwachsalkohole

Wollwachsalkohollösungen verschiedener Konzentration in Ether wurden auf der Kieselgelsäule getrennt und die Fläche von Cholesterol berechnet. Aus den Mittelwerten wurde die Eichgerade nach der Formel y= a + bx bestimmt.

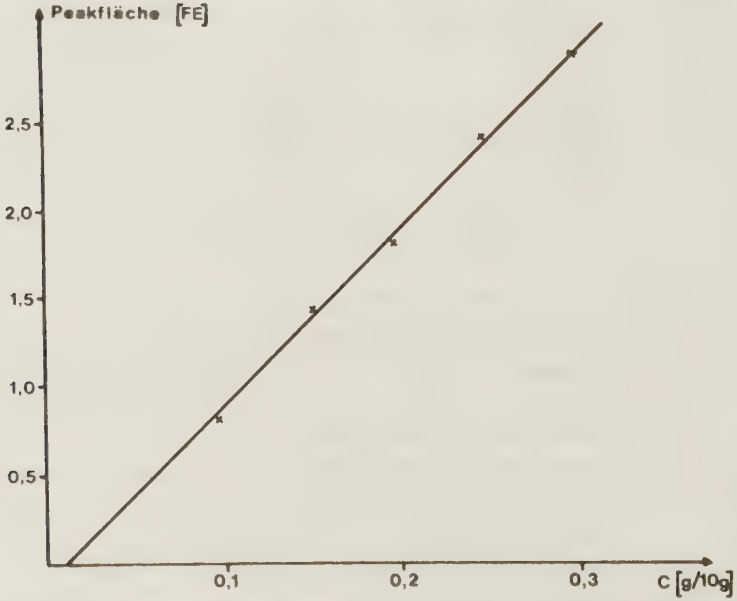


Abb.18: Eichgerade zur Ermittlung des Gehalts an Wollwachsalkoholen in der Wollwachsalkoholsalbe

Die Gleichung der Eichgeraden lautet

$$y = - 0,232 + 10,50 \, x$$

Für das Bestimmtheitsmaß wurde berechnet

$$r^2 = 0,995$$

Mit dieser Eichgeraden wurden Wollwachsalkoholsalben verschiedener Herkunft überprüft. Nach DAB 8 sollten in 100 g Salbe 6 g Wollwachsalkohole enthalten sein. In den untersuchten Salben lag der Gehalt an Wollwachsalkoholen um 6,32%, 9,53%, 9,82% und 14,29% unter dem Sollwert. Die Ursache liegt wahrscheinlich in der Herstellungsvorschrift des Arzneibuches, nach der alle Bestandteile der Salbe auf dem Wasserbad geschmolzen und bis zum Erkalten gerührt werden. Da die Wollwachsalkohole schneller fest werden als das Vaselin, setzen sie sich ab und kleben am Boden des Gefäßes. Auch durch ständiges Rühren läßt sich der festgeklebte Teil nicht vollständig in das Vaselin einrühren.

3. Quantitative Bestimmung von Cetylstearylalkohol in der Hydrophilen Salbe

Der wichtigste Bestandteil der Hydrophilen Salbe ist der Emulgierende Cetylstearylalkohol. Er besteht aus 85,7% Cetylstearylalkohol, 9,5% cetylstearylschwefelsaurem Natrium und 4,8% Wasser. Im DAB 8 wird eine quantitative Bestimmung nur in der Monographie des cetylstearylschwefelsauren Natriums vorgeschrieben, bei der Hydrophilen Salbe nicht. Nach dieser Vorschrift werden die Fettalkohole mit einer Mischung aus Ether und Benzin extrahiert und gravimetrisch bestimmt. Das cetylstearylschwefelsaure Natrium wird in dem Zweiphasensystem Wasser/Chloroform nach Zusatz von verdünnter Schwefelsäure mit Cetylpyridiniumchlorid gegen Dimethylgelb titriert.

Für eine quantitative Bestimmung durch HPLC eignet sich am besten der Cetylstearylalkohol. Der Versuch, eine Trennung der beiden Alkohole wie bei der Dünnschichtchromatographie durch reversed-phase-Chromatographie mit Methanol als Elutionsmittel zu erzielen, brachte keinen Erfolg. Mit einem Gemisch von Acetonitril und Isopropanol gelang schließlich die Auftrennung. Da das Arzneibuch nicht fordert, daß der Cetylstearylalkohol aus gleichen Teilen Cetyl- und Stearylalkohol besteht, muß damit gerechnet werden, daß die Zusammensetzung je nach Herkunft verschieden ist. Daher wurden bei der Bestimmung der Hydrophilen Salbe beide Alkohole quantitativ ermittelt.

Wie aus den folgenden Hochdruckflüssigkeitschromatogrammen ersichtlich ist, liefert die Gesamtbestimmung der beiden Peakflächen genauere Werte als die Summe der Einzelbestimmungen, da die Auflösung der Peaks nur 1,0 beträgt.

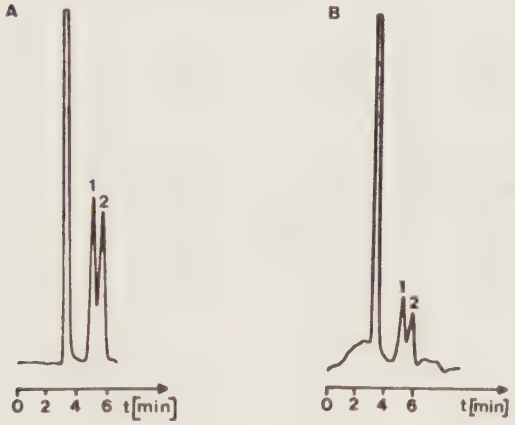


Abb.19: A: HPLC von Cetylstearylalkohol
B: HPLC der Hydrophilen Salbe

Fließmittel: Acetonitril + Isopropanol = 8 + 2
LiChrosorb^{R} RP-8 10 µm
Säule 250 mm lang, ø 4,0 mm
Durchfluß 0,90 ml/min

Peak 1: Cetylalkohol
Peak 2: Stearylalkohol
Detektion: RI-Detektor

Eichgerade von Cetylstearylalkohol

Für die Erstellung der Eichgeraden wurden wie bei den anderen Salbengrundlagen jeweils 20 µl einer Lösung bestimmter Konzentration von Cetylstearylalkohol in Diethylether auf die Säule gebracht. Aus der Messung von fünf verschiedenen Konzentrationen wurde eine Eichgerade mit folgender Gleichung ermittelt

$$y = 0{,}123 + 33{,}889\ x$$

Als Bestimmtheitsmaß erhielt man $r^2 = 0{,}990$.

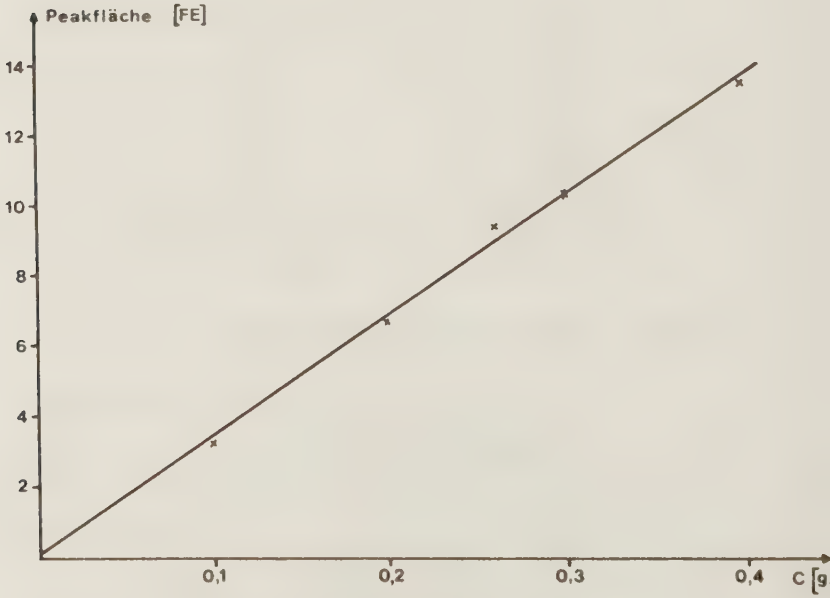


Abb.20: Eichgerade zur Ermittlung des Gehaltes an Cetylstearylalkohol in der Hydrophilen Salbe

Mit der Eichgeraden wurden Hydrophile Salben verschiedener Herkunft auf ihren Gehalt an Cetylstearylalkohol untersucht. Die Abweichung vom vorgeschriebenen Wert des Arzneibuches waren jeweils sehr gering: 0,10%, 0,21%, 0,83% und 1,15%.

4. Quantitative Bestimmung der Kühlsalbe

Da das in der Salbe enthaltene Wachs und der Walrat aus Ester etwa gleicher Kettenlänge bestehen, war eine optimale Trennung und damit eine genaue quantitative Bestimmung nicht möglich. Es wurde deshalb das Erdnußöl bestimmt, das den Hauptbestandteil der Kühlsalbe ausmacht.

Abb.21: HPLC der Kühlsalbe

Fließmittel: Ethylacetat + Acetonitril = 7 + 3
LiChrosorb^{R} RP-8 10 µm
Säule 250 mm lang, ø 4,0 mm
Durchfluß 0,80 ml/min

Peak 1: Erdnußöl
Detektion: RI-Detektor

Das Gemisch Ethylacetat + Acetonitril = 7 + 3 wurde sowohl als Lösungsmittel für die Salbe als auch als Elutionsmittel benutzt. Als Lösungsmittel für die Salbe hatte es den Vorteil, daß es nur das zu bestimmende Erdnußöl löste. Der Walrat und das Wachs konnten abzentrifugiert werden. Außerdem erscheint bei der Verwendung des Lösungsmittels als Elutionsmittel kein Lösungsmittelpeak, der die Bestimmung beeinträchtigen könnte. Mit Isopropanol als Lösungsmittel für die Kühlsalbe wurde der Peak des Erdnußöls nur unvollständig vom Peak des Isopropanols getrennt. Da die Auflösung kleiner als 1 war, konnte keine genaue quantitative Bestimmung durchgeführt werden.

Eichgerade zur Bestimmung von Erdnußöl in der Kühlsalbe

Für die Erstellung der Eichgerade wurden vier Lösungen von Erdnußöl verschiedener Konzentration hergestellt und jeweils 20 µl auf die Säule gerbacht.

Für die Eichgerade konnte folgende Gleichung aufgestellt werden

$$y = - 0{,}133 + 6{,}328\ x$$

Als Bestimmtheitsmaß erhielt man $r^2 = 0{,}993$.

Bei der Untersuchung von vier Kühlsalben verschiedener Herkunft auf ihren Gehalt an Erdnußöl wurde annähernd der im DAB 8 vorgeschriebene Gehalt von 60% erhalten. Die Abweichungen betrugen 0,66%, 0,78%, 0,90% und 1,26%.

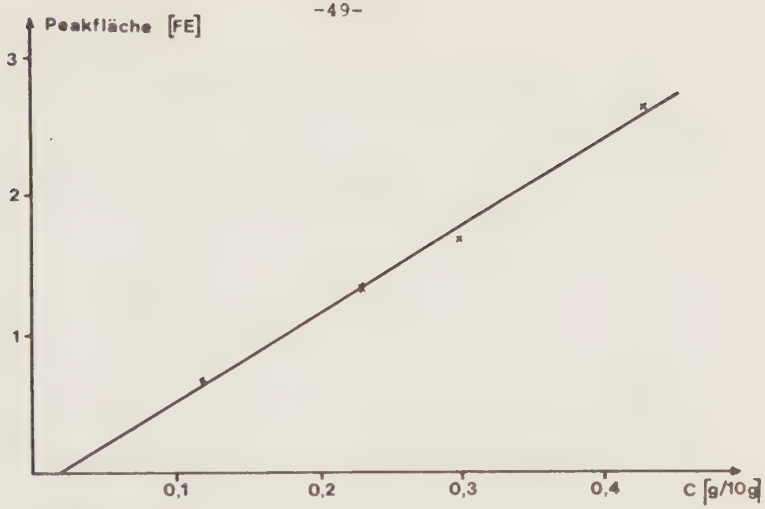


Abb.22: Eichgerade zur Bestimmung von Erdnußöl in der Kühlsalbe

5. Quantitative Bestimmung der Polyethylenglykolsalbe

Durch "reversed-phase"-Chromatographie konnten die beiden Polyethylenglykolkomponenten getrennt werden. Zweistoffmischungen lassen sich auch ohne Eichgerade quantitativ analysieren. Man stellt sich von den reinen Stoffen je eine Lösung genau gleicher Konzentration her und bestimmt das Flächenverhältnis der Peaks.

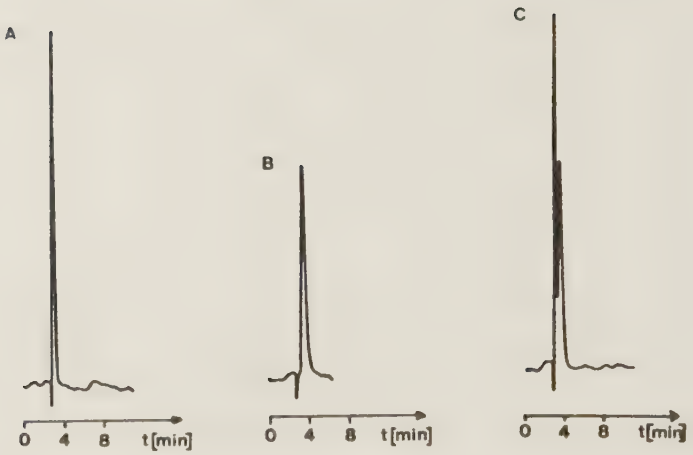


Abb.23: A: HPLC von PEG 300 (0,1 g in 10 g Lösungsmittel)
B: HPLC von PEG 1500 (0,1 g in 10 g Lösungsmittel)
C: HPLC von PEG-Salbe (0,2 g in 10 g Lösungsmittel)

Fließmittel: Methanol + Wasser = 65 + 35
LiChrosorb^{R} RP-8 10 µm
Säule 250 mm lang, ø 4,0 mm
Durchfluß 0,90 ml/min
Detektion: RI-Detektor

Man erhielt den Faktor

$$\frac{\text{Peakfläche von PEG 300}}{\text{Peakfläche von PEG 1500}} = 0{,}87$$

Eine Polyethylenglykolsalbe entsprach der Vorschrift des DAB 8, wenn unter den gewählten Bedingungen das Verhältnis der beiden Flächenpeaks 0,87 war.

Bei der Bestimmung des Peakflächenverhältnisses von PEG 300 und PEG 1500 in vier verschiedenen PEG-Salben wurde jeweils 0,87 ermittelt. Die Zusammensetzung der Salben entsprach damit dem Arzneibuch.

6. Quantitative Bestimmung der Zinksalbe

Da die Zinksalbe aus 10% Zinkoxid und 90% Wollwachsalkoholsalbe besteht, wurde die quantitative Bestimmung wie bei der Wollwachsalkoholsalbe durchgeführt. Der Gehalt an Wollwachsalkoholen wurde durch die Flächenauswertung des Cholesterolpeaks ermittelt. Das Zinkoxid mußte vor der Bestimmung abgetrennt werden. Dazu wurde die Zinksalbe in Diethylether suspendiert und das Zinkoxid und das nicht gelöste Vaselin abzentrifugiert.

Die Eichgerade der Wollwachsalkohole wurde schon bei der Wollwachsalkoholsalbe aufgezeichnet (s.S.42). Die Gleichung war $y = -0{,}232 + 10{,}50\ x$.

Bei der Überprüfung von Zinksalben verschiedener Herkunft wurde wie schon bei der Wollwachsalkoholsalbe ein zu niedriger Gehalt an Wollwachsalkoholen festgestellt. Nach DAB 8 sollten in 100 g Salbe 5,4 g Wollwachsalkohole enthalten sein. Die ermittelten Werte lagen um 5,41%, 7,90%, 11,81% und 13,20% unter dem Sollwert.

IV. Abtrennung der Arzneistoffe von den Salbengrundlagen[+)]

Von Sucker wurde für die Analyse von Wirkstoffen, Hilfs- und Grundstoffen in Salben ein Trennungsgang ausgearbeitet[33)]. Dabei wurden neben der azeotropen Destillation, der Extraktion und der Ausfällung besonders die Säulen-Adsorptionschromatographie, die Säulen-Verteilungschromatographie, die Abtrennung durch makroretikulare Ionenaustauscher und die Bildung abtrennbarer Derivate zu Hilfe genommen.

Für die Salbengrundlagen des Arzneibuches sollte ein Trennungsgang entwickelt werden, der es mit geringem zeitlichen und apparativen Aufwand ermöglicht, Arzneistoffe von den Salbengrundlagen zu isolieren. Es wurden Salbenpräparate aus der Roten Liste 1982 mit den in Tab.1 und 2 aufgeführten Arzneistoffen und Konservierungsmittel ausgewählt. Diese Stoffe wurden in die jeweiligen Salbengrundlagen des Arzneibuches eingearbeitet.

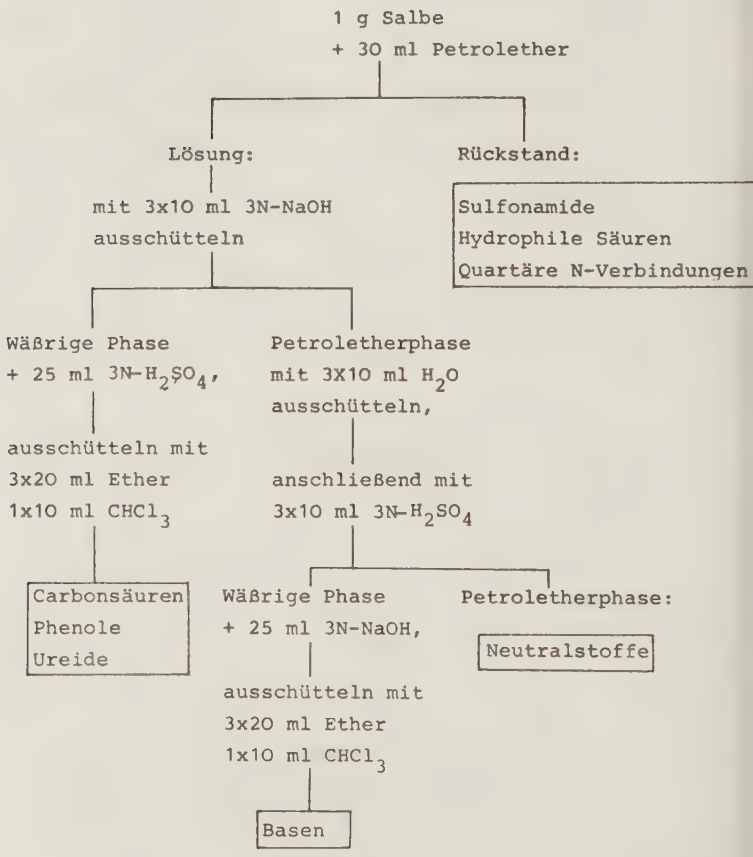
[+)] Dieser ausgearbeitete Analysengang von Arzneistoffen aus Salben wurde in das Praktikumsbuch von H.Auterhoff und K.-A.Kovar, Identifizierung von Arzneistoffen übernommen.

Tab.1 Arzneistoffe	
Antazolin	Lidocain
Atropin	Mafenid
Bamipin	Mofebutazon
Benzocain	Oxyphenbutazon
Benzylpenicillin	Phenylbutazon
Chloramphenicol	Propyphenazon
Clioquinol	Rutosid
Clotrimazol	Salicylamid
Diphenhydramin	Salicylsäure
Ephedrin	Sulfanilamid
Ethacridin	Sulfaguanidin
Flufenaminsäure	Sulfamethoxazol
Hydrocortison	Sulfathiazol
Isothipendyl	Sulfisomidin
Indometacin	Tetracyclin

Tab.2: Konservierungsmittel
Benzoesäure
Nipagin
Nipasol

1. Isolierung von Arzneisubstanzen aus der Wollwachsalkoholsalbe, der Hydrophilen Salbe, der Kühlsalbe und aus Lanolin

Zur Isolierung von Arzneisubstanzen aus der Wollwachsalkoholsalbe, der Hydrophilen Salbe, der Kühlsalbe und aus Lanolin wurde folgender Analysengang durchgeführt.



In der Gruppe der Carbonsäuren, Phenole und Ureide wurden folgende Substanzen isoliert

Benzoesäure	Mofebutazon
Benzylpenicillin	Oxyphenbutazon
Clioquinol	Phenylbutazon
Clotrimazol	Salicylamid
Flufenaminsäure	Salicylsäure
Nipagin	Sulfamethoxazol
Nipasol	Sulfisomidin

Folgende Basen wurden von den Salbengrundlagen abgetrennt

Antazolin	Ephedrin
Atropin	Ethacridin
Bamipin	Isothipendyl
Diphenhydramin	Lidocain

In der Gruppe der Sulfonamide, hydrophilen Säuren und quartären N-Verbindungen wurden gefunden

Mafenid	Sulfathiazol
Rutosid	Sulfisomidin
Sulfanilamid	Tetracyclin
Sulfaguanidin	

Folgende Neutralstoffe wurden isoliert

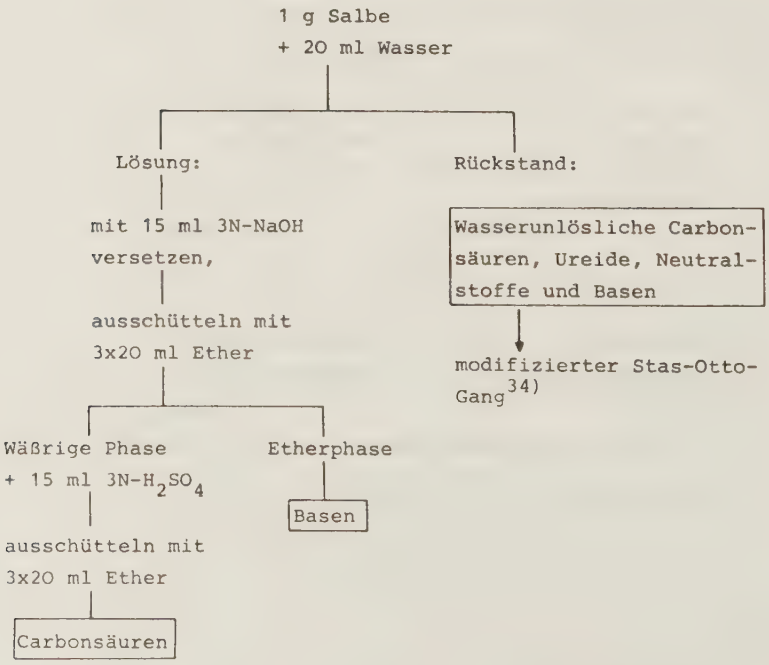
Benzocain	Hydrocortison
Chloramphenicol	Propyphenazon

Die isolierten Substanzen wurden jeweils dünnschichtchromatographisch identifiziert[34].

2. Isolierung der Arzneistoffe aus der Polyethylenglykolsalbe

Zur Isolierung von Arzneisubstanzen mußte der für die anderen Salbengrundlagen beschriebene Analysengang modifiziert werden, weil sich die PEG-Salbe nicht in Petrolether löst. Sie ist wasserlöslich.
Bei der Auswahl der Arzneistoffe, die in die PEG-Salbe eingearbeitet wurden, mußte die Unverträglichkeit mancher Arzneistoffe wie z.B. der Phenole und Sulfonamide mit Polyethylenglykolen beachtet werden.

Aus der PEG-Salbe wurden die Arzneistoffe nach folgendem Schema isoliert



Die isolierten Säuren und Basen wurden nach Eindampfen des Lösungsmittels dünnschichtchromatographisch identifiziert. Die nicht gelösten Substanzen wurden durch den Stas-Otto-Gang[34)] getrennt und anschließend chromatographiert.

3. Isolierung von Arzneisubstanzen aus der Zinkpaste und der Zinksalbe

Aus der Zinkpaste wurden Arzneistoffe isoliert, indem man das Zinkoxid, die Weizenstärke und einen Teil des Vaselins durch eine Extrelut^{R}-Säule abtrennte. Eine wäßrige Suspension der Salbe wurde auf die Säule gegeben und die Arzneistoffe mit Ethanol eluiert. Das Eluat wurde eingedampft und der Rückstand in Petrolether gelöst. Mit dieser Lösung konnte der für Lanolin und andere Salbengrundlagen beschriebene Analysengang durchgeführt werden.

Mit der Zinksalbe wurde ähnlich verfahren. Das Zinkoxid konnte mit einer Extrelut^{R}-Säule abgetrennt werden. Die Arzneistoffe und die Wollwachsalkoholsalbe wurden mit Ethanol eluiert. Nach Abdampfen des Lösungsmittels wurde der Analysengang durchgeführt.

VI. Chromatographische Bestimmung der Emulgatoren des Arzneibuches

Folgende Emulgatoren sind im DAB 8 und im Europäischen Arzneibuch (I-III) aufgeführt

Glycerolmonostearat (Ph.Eur.)
Polysorbatum 20 (Ph.Eur.)
Polysorbatum 60 (Ph.Eur.)
Polysorbatum 80 (Ph.Eur.)
Polyaethylenglykol-400-stearat (DAB 8)

1. Glycerolmonostearat

Es handelt sich um ein Gemisch von Monoglyceriden der Stearin- und Palmitinsäure mit wechselnden Mengen von Di- und Triglyceriden[35]. Das Europäische Arzneibuch fordert mindestens 35% Monoglyceride. Glycerolmonostearat wird als W/O-Emulgator eingesetzt[36].

Nach der Ph.Eur. wird die Identität folgendermaßen festgestellt

A, Durch Erhitzen von Glycerolmonostearat mit Kaliumhydrogensulfat wird aus dem Glycerolanteil Acrolein gebildet, das mit Neßlers Reagens nachgewiesen wird.

B, Man verseift Glycerolmonostearat mit ethanolischer Kalilauge und extrahiert die freien Fettsäuren mit Ether. Nach Abdampfen des Lösungsmittels bestimmt man den Schmelzpunkt der Fettsäuren in der offenen Kapillare.

Dünnschichtchromatographische Identifizierung von Glycerolmonostearat

Als Sorbens wurden normale Kieselgelplatten, HPTLC-Kieselgelplatten und "reversed phase"-HPTLC-Kieselgelplatten verwendet. Mit den RP-Kieselgelplatten wurden die Glyceride wesentlich besser getrennt (vgl. Abb.26).

Auf den normalen DC-Platten wurde mit dem Fließmittelgemisch Diethylether + Petrolether + Eisessig = 50 + 50 + 1 chromatographiert[37]. Die Detektion erfolgte durch Besprühen mit einer ethanolischen 2,7-Dichlorfluoresceinlösung[38]. Nach kurzem Erhitzen bei 100° konnte man im UV-Licht bei 254 nm die Glyceride als fluoreszierende Flecke erkennen. Die Monoglyceride zeigten einen R_f-Wert von 0,035. Bei den Diglyceriden wurden zwei Flecke mit den R_f-Werten von 0,16 und 0,25 sichtbar. Es handelte sich wahrscheinlich um Glyceroldistearat und Glyceroldipalmitat. Bei R_f= 0,65 fluoreszierten die Triglyceride.

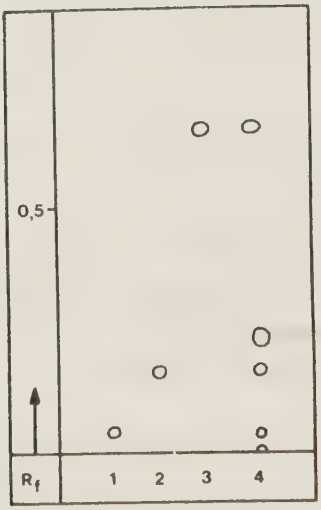


Abb.24: DC von Glycerolmonostearat

Sorbens: DC-Fertigplatte Kieselgel 60 F_{254}

Fließmittel: Diethylether + Petrolether + Eisessig = 50 + 50 + 1

Laufstrecke: 10 cm
Laufzeit: 17 min

1 = Glycerol-1-monostearat (rein)

2 = Glycerol-1,2-distearat (rein)

3 = Glyceroltristearat

4 = Glycerolmonostearat (nach Ph.Eur)

Detektion: 2,7 Dichlorfluorescein-Reagens, Erhitzen bei 100°, UV 254

Mit dem gleichen Fließmittelgemisch konnte Glycerolmonostearat auf HPTLC-Kieselgelplatten chromatographiert werden. Die Entwicklungszeit wurde um 7 Minuten gegenüber den normalen Kieselgelplatten verkürzt. Die Detektion erfolgte wieder mit 2,7-Dichlorfluorescein.

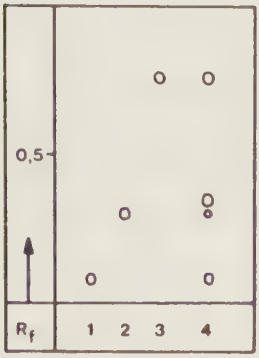


Abb.25: HPTLC von Glycerolmonostearat

Sorbens: HPTLC-Fertigplatten Kieselgel 60 F_{254}

Fließmittel: Diethylether + Petrolether + Eisessig = 5,0 + 5,0 + 0,1

Laufstrecke: 6 cm
Laufzeit: 10 min

1 = Glycerol-1-monostearat (rein)

2 = Glycerol-1,2-distearat (rein)

3 = Glyceroltristearat

4 = Glycerolmonostearat (nach Ph.Eur.)

Detektion siehe Abb.24

Auf RP-HPTLC-Platten wurde Glycerolmonostearat mit dem Fließmittel Ethylacetat + Ethanol + Methanol = 4 + 3 + 3 getrennt. Nach Besprühen der RP-Platte mit 2,7-Dichlorfluorescein konnten die Flecken im UV-Licht nur ungenau erkannt werden. Erst als das 2,7-Dichlorfluorescein im Fließmittel gelöst bis zur Front aufgestiegen war, konnte man die Glyceride im UV-Licht bei 254 nm deutlich sehen. Der Emulgator wurde in acht Fraktionen getrennt. Die Trigylceride hatten den kleinsten R_f-Wert (0,18). Die verschiedenen Diglyceride der Palmitin- und Stearinsäure zeigten R_f-Werte von 0,38 bis 0,52. Bei R_f= 0,67 und 0,71 handelte es sich um Monoglyceride.

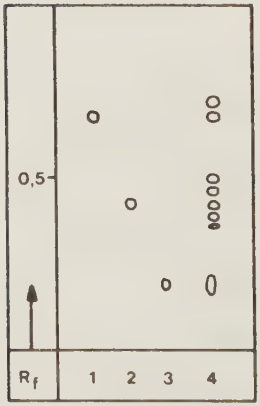


Abb.26: RP-HPTLC von Glycerolmonostearat

Sorbens: RP-18-HPTLC-Kieselgelplatte

Fließmittel: Ethylacetat + Ethanol + Methanol = 4 + 3 + 3

Laufstrecke: 7 cm
Laufzeit: 18 min

1 = Glycerol-1-monostearat (rein)
2 = Glycerol-1,2-distearat (rein)
3 = Glyceroltristearat
4 = Glycerolmonostearat (nach Ph.Eur.)

Detektion: 2,7-Dichlorfluorescein Reagens, Zusatz von 0,1% im Fließmittel, UV 254

Quantitative Bestimmung der Monoglyceride im Glycerolmonostearat durch HPLC

Das Arzneibuch bestimmt den Gehalt an Monoglyceriden nach Malaprade. Dabei werden die Monoglyceride aufgrund der vicinalen Hydroxylgruppen mit Natriumperiodat gespalten. Der Periodatverbrauch wird durch Zugabe von Kaliumiodid und Rücktitration des ausgeschiedenen Iods mit Natriumthiosulfatlösung ermittelt. Es wurde versucht, die Monoglyceride durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie zu bestimmen. Mit dem Elutionsmittel Chloroform + Methanol = 9 + 1 konnten die Glyceride auf LiChrosorb^{R} Si 60 getrennt werden (vgl. Abb.27).

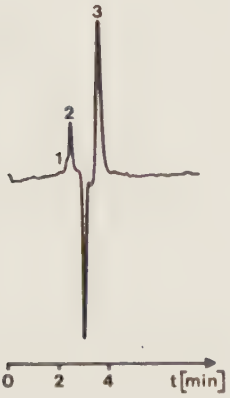


Abb.27: HPLC von Glycerolmonostearat

Fließmittel: Chloroform 9 Teile/ Methanol 1 Teil

LiChrosorb^{R} Si 60, 7 µm

Säule 250 mm lang, ø 4 mm

Durchfluß 0,90 ml/min

Peak 1: Triglyceride

Peak 2: Diglyceride

Peak 3: Monoglyceride

Detektion: RI-Detektor

Die quantitative Bestimmung erfolgte nach der Zumischmethode. Dabei wurden zu zwei einprozentigen Lösungen von Glycerolmonostearat, das auch Di- und Triglyceride enthielt, 0,10 g und 0,15 g reines Glycerolmonostearat zugesetzt und die Peakfläche der Monoglyceride bestimmt. Außerdem wurde die Peakfläche der Monoglyceride von einer einprozentigen Glycerolmonostearat-Lösung ohne Zusatz bestimmt. Aus den Mittelwerten der Peakflächen wurde die Gerade mit folgender Gleichung berechnet

$$y = 0{,}362 + 10{,}51\ X$$

Das Bestimmtheitsmaß war $r^2 = 0{,}995$.

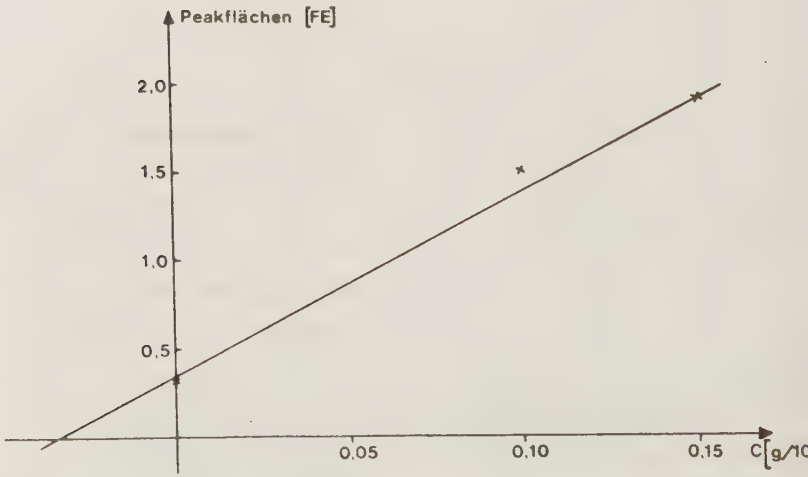


Abb.28: Gerade zur Bestimmung der Monoglyceride im Glycerolmonostearat

Aus dem Schnittpunkt der Geraden mit der x-Achse konnte der Monoglyceridgehalt des mit Di- und Triglyceriden verunreinigten Glycerolmonostearats ermittelt werden; er betrug 34%. Zum Vergleich wurde die vom Arzneibuch vorgeschriebene Bestimmung nach Malaprade durchgeführt und ein Gehalt von nur 32% ermittelt. Nach Kommentar Ph.Eur.III ist diese Methode mit einem realtiv großen Fehler behaftet, so daß das ausgearbeitete HPLC-Verfarhen trotz der verhältnismäßig großen Standardabweichung von 1,1% (VK= 2,9%) vorzuziehen ist.

2. Polyethylenglykol-Sorbitanfettsäureester

Sie stellen Emulgatoren des Typs O/W dar, wobei durch die Länge der Polyoxyethylenkette die Hydrophilie beeinflußt wird. Die Polyethylenglykol-Sorbitanfettsäureester werden als Tween^{R} bezeichnet[29)]. Es handelt sich um Gemische von Partialestern des Sorbits und seiner Anhydride mit Laurinsäure, Palmitinsäure oder Ölsäure.

Tab.3: Polyoxyethylensorbitan-Fettsäureester des Europäischen Arzneibuches

Fettsäure	Bezeichnung nach der Ph.Eur.	Handelsname
Laurinsäure	Polysorbat 20	Tween^{R} 20
Stearinsäure	Polysorbat 60	Tween^{R} 60
Ölsäure	Polysorbat 80	Tween^{R} 80

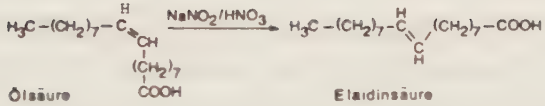
PEG-sorbitanlaurat und PEG-sorbitanstearat werden nach der Ph.Eur. wie folgt nachgewiesen.

A, Löst man Polysorbat 20 und 60 in Wasser, so tritt beim Schütteln durch die Herabsetzung der Oberflächenspannung des Wassers eine kräftige Schaumentwiclung auf. Gibt man NaCl zu der Lösung und erhitzt, so wird die Lösung trüb.

B, Nach Verseifung von Polysorbat 20 bzw. 60 bestimmt man die Säurezahl der isolierten Fettsäuren.

Da PEG-sorbitanoleat ein Ester der Ölsäure ist, werden nach der Ph.Eur. außer der Schaumentwicklung folgende Reaktionen zur Identifizierung durchgeführt

A, Polysorbat 80 wird mit KOH verseift. Die freie Ölsäure wird mit Petrolether extrahiert und mit Natriumnitrit in die feste stereoisomere Elaidinsäure überführt, die bei 45^{o} schmilzt.



B, Der ungesättigte Charakter wird durch Anlagerung von Brom an die Doppelbindung der Ölsäure nachgewiesen.

Dünnschichtchromatographische Identifizierung von Polysorbat 20 und 60

Polysorbat 20 und 60 wurden auf HPTLC-Kieselgelplatten mit dem Fließmittelgemisch Ethylacetat + Methanol + Wasser = 7 + 2 + 1 chromatographiert. Es mußte zweimal entwickelt werden, damit man eine Trennung erkennen konnte.

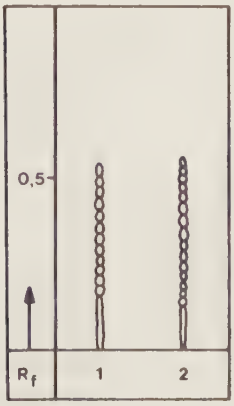


Abb.29: HPTLC von Polysorbat 20 und 60

Sorbens: HPTLC-Fertigplatten Kieselgel 60 F_{254}

Fließmittel: Ethylacetat + Methanol + Wasser= 7+2+1

Laufstrecke: 2 x 7 cm

Laufzeit: 2 x19 min

1 = Polysorbat 20

2 = Polysorbat 60

Detektion: mod.Dragendorffs Reagens + Bariumchlorid-Lösung

Die Detektion erfolgte durch Besprühen mit einer Mischung aus zwei Teilen Dragendorffs Reagens und einem Teil Bariumchloridlösung. Die PEG-Derivate wurden als orangerote Flecke sichtbar. Die Umsetzungsprodukte mit den niedrigsten Molzahlen an Ethylenoxid hatten die größten R_f-Werte, während die höheren Oxethylierungsgrade mit zunehmender Molzahl sich näher am Startpunkt befanden.

Dünnschichtchromatographische Identifizierung von Polysorbat 80

Polysorbat 80 wurde auf HPTLC-Platten mit dem Fließmittelgemisch Ethylacetat + Methanol + Wasser chromatographiert. Bei einer Laufstrecke von 8 cm erhielt man eine gute Trennung, auch wenn nur einmal entwickelt wurde.

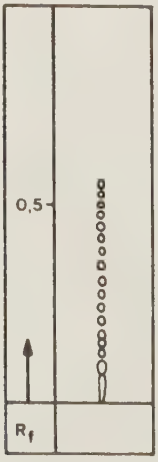


Abb.30: HPTLC von Polysorbat 80

Sorbens: HPTLC-Fertigplatten Kieselgel 60 F_{254}

Fließmittel: Ethylacetat + Methanol + Wasser = 7 + 2 + 1

Laufstrecke: 8 cm

Laufzeit : 22 min

Detetkion : a) siehe Abb.29

b) Molybdatophosphorsäur Reagens; Erhitzen bei 100°

Polysorbat 80 konnte von Polysorbat 20 bzw. 60 unterschieden werden, indem durch Besprühen mit Molybdatophosphorsäure der ungesättigte Charakter von Polysorbat 80 nachgewiesen wurde. Die verschiedenen Ester von Polysorbat 80 färbten sich blau, während die Ester von Polysorbat 20 bzw. 60 keine Färbung zeigten.

3. Polyethylenglykol-400-stearat

PEG-400-stearat ist ein Monoester von PEG 400 mit Stearinsäure. Wie bei den anderen Emulgatoren handelt es sich nicht um eine einheitliche Substanz, sondern um ein Gemisch homologer Ester der Stearinsäure mit Polyethylenglykolen unterschiedlichen Molekulargewichts. Seine mittlere Zusammensetzung entspricht der Formel

$$H_{35}C_{17}- \underset{\underset{O}{\|}}{C} - (OCH_2- CH_2-)_9- OH.$$

Nach DAB 8 wird PEG-400-stearat folgendermaßen identifiziert

Beim Erhitzen der Substanz mit Schwefelsäure entsteht Dioxan, das mit Quecksilber(II)-chlorid einen weißen Niederschlag bildet und mit Neßlers Reagens getränktes Filterpapier schwarz färbt.

Dünnschichtchromatographische Identifizierung von PEG-400-stearat

Der Emulgator wurde auf normalen Kieselgelplatten und auf HPTLC-Kieselgelplatten mit dem Fließmittelgemisch Ethylacetat + Isopropanol + Wasser = 55 + 30 + 15 chromatographiert[39]. Die Trennung der Ester unterschiedlichen Molekulargewichts blieb gleich. Auf den normalen Platten dauerte die Entwicklung 20 Minuten länger als auf HPTLC-Platten.

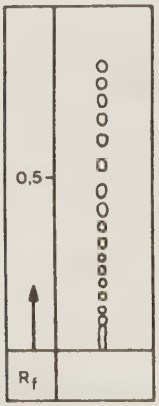


Abb.31: HPTLC von PEG-400-stearat
Sorbens: HPTLC-Fertigplatten Kieselgel 60 F_{254}
Fließmittel: Ethylacetat + Isopropanol + Wasser = 5,5 +3,0+
Laufstrecke: 7 cm
Laufzeit: 30 min
Detektion: siehe Abb.29

Die Detektion erfolgte durch Besprühen mit einer Mischung aus Dragendorffs Reagens und Bariumchloridlösung. Die Polyethylenglykolester unterschiedlichen Molekulargewichts wurden als eine Kette orangeroter Flecken sichtbar.

VII. Zusammenfassung

Im Arzneibuch ist die Analytik von Salbengrundlagen und Emulgatoren beschränkt auf allgemeine Nachweisreaktionen und auf die Bestimmung von Kennzahlen. Vorschriften zur quantitativen Bestimmung findet man nur beim Glycerolmonostearat. Es wurde daher versucht, durch chromatographische Methoden die Salbengrundlagen und Emulgatoren des Arzneibuches qualitativ und quantitativ zu analysieren.

Die qualitative Untersuchung der Salbengrundlagen und Emulgatoren erfolgte dünnschichtchromatographisch. Es wurde auf normalen Kieselgelplatten und auf HPTLC-Kieselgelplatten unter gleichen Bedingungen chromatographiert. Auf den Hochleistungs-DC-Platten dauerte die Entwicklung 10 bis 15 Minuten gegenüber 30 Minuten auf normalen DC-Platten. Die bessere Trennleistung der HPTLC-Platten zeigte sich dadurch, daß beim Lanolin ein weiterer Steroid-Ester und bei der Wollwachsalkoholsalbe ein weiteres Steroid detektiert werden konnte. Die Hydrophile Salbe, die Kühlsalbe und der Glycerolmonostearat wurden auf "reversed phase"-HPTLC-Platten besser getrennt als auf nicht modifizierten HPTLC-Platten.

Die quantitative Bestimmung der Salbengrundlagen und Emulgatoren erfolgte durch die Hochdruckflüssigkeitschromatographie. Es mußten zuerst geeignete Trennbedingungen ausgearbeitet werden. Eine Übertragung der Bedingungen von der DC auf die HPLC war nur beim Lanolin und

bei der Wollwachsalkoholsalbe möglich. Es wurde jeweils der wichtigste, charakteristische Bestandteil der Salbe oder des Emulgators ermittelt, indem die Fläche seines Peaks auf dem Chromatogramm berechnet wurde. Beim Lanolin wurde der Gehalt an Wollwachs bestimmt, bei der Wollwachsalkoholsalbe und der Zinksalbe der Gehalt an Wollwachsalkoholen, bei der Hydrophilen Salbe der Gehalt an Cetylstearylalkohol, bei der Kühlsalbe der Gehalt an Erdnußöl und bei der PEG-Salbe der Anteil von PEG 300 und PEG 1500. Beim Glycerolmonostearat, einem Gemisch aus Mono-, Di- und Triglyceriden, wurde der Gehalt an Monoglyceriden bestimmt.

Da das Detektorsignal von speziellen Stoffeigenschaften und von den chromatographischen Bedingungen abhängig ist, muß für jede quantitative Analyse ein Eichchromatogramm ausgeführt werden. Bei der Untersuchung von Salben verschiedener Herkunft konnten beim Lanolin, bei den Hydrophilen Salben, den Kühlsalben und den PEG-Salben annähernd die im Arzneibuch vorgeschriebenen Werte ermittelt werden. Bei den verschiedenen Wollwachsalkoholsalben und Zinksalben waren jedoch erhebliche Abweichungen vom Sollwert festzustellen.

Zur Abtrennung der Arzneistoffe von den Salbengrundlagen wurde ein dem Stas-Otto-Gang ähnlicher Trennungsgang entwickelt. Die sauren und basischen Stoffe, die in die

Salben des Arzneibuches eingearbeitet waren, konnten aus der Lösung der Salbe mit Natronlauge bzw. Schwefelsäure gefällt und mit einem organischen Lösungsmittel extrahiert werden. Nach Eindampfen des Lösungsmittels wurden die Arzneistoffe dünnschichtchromatographisch identifiziert. Die Neutralstoffe und die nicht ausschüttelbaren Stoffe wurden aus der Lösung der Salbe direkt auf die DC-Platten aufgetragen. Dieser Analysengang wurde in die 4.Auflage des Praktikumsbuches von H.Auterhoff und K.-A.Kovar aufgenommen.

VII. Experimenteller Teil

Arbeitsanweisung zur Dünnschichtchromatographie der Salbengrundlagen

Zur Dünnschichtchromatographie der Salbengrundlagen wurden folgende DC-Platten verwendet:

DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F_{254},	20x20 cm
HPTLC-Kieselgelplatten 60 F_{254},	10x10 cm
RP-8-HPTLC-Kieselgelplatten,	10x10 cm
RP-18-HPTLC-Kieselgelplatten,	10x10 cm

Die aufgeführten Platten lieferte die Fa. Merck.

Die Salben wurden zum Auftragen auf die DC-Platte in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst, hauptsächlich in Diethylether, Chlorofom oder Methanol. Die Auftragemenge lag bei normalen Kieselgelplatten zwischen 10 und 50 µg, das entspricht 1 bis 5 µl einer 1%igen Lösung (10 mg/ml). Bei HPTLC-Platten wurden etwa 2 bis 8 µg aufgetragen, das etwa 0,2 bis 0,8 µl einer 1%igen Lösung entspricht. Die Startpunkte wurden mit einem ausgezogenen Kapillarröhrchen 15 mm von der Unterkante der normalen DC-Platte und 7 mm von der Unterkante der HPTLC-Platte aufgetragen.

Entwickelt wurde in der sog. Normalkammer unter Kammersättigung. Die Kammer für die HPTLC-Platten war wesentlich kleiner. Sie hatte die Maße 13x13x6 cm. In die mit Filterpapier ausgekleideten Kammern wurden 10 bzw. 100 ml Fließmittel eingebracht.

Für die Fließmittelgemische wurden Lösungsmittel in der Reinheitsforderung des Arzneibuches verwendet, mit Ausnahme von Ethanol, der mit Petrolether vergällt war. Die Kammer für die normalen DC-Platten blieb 30 Minuten bis zur Kammersättigung verschlossen. In die kleinen Kammern konnte die Platte schon nach 5-10 Minuten eingestellt werden.

Die Chromatogramme wurden zuerst unter der UV-Lampe bei 254 bzw. 366 nm betrachtet. Dabei wurden Substanzen erkannt, die Fluoreszenzlöschung oder -anregung bewirkten. Zur Sichtbarmachung von Substanzen, die gar nicht oder nur schwach im UV-Licht zu sehen waren, wurden Sprühmittel benutzt.

Sprühreagenzien zur Detektion der Salbengrundlagen:

Antimon(III)-chlorid

25,0 g Antimon(III)-chlorid wurden in 75 g Chloroform gelöst.

Molybdatophosphorsäure

10,0 g Molybdatophosphorsäure wurden in 90 g Ethanol (96%) gelöst.

Modifiziertes Dragendorffs Reagenz

Stammlösung: 0,85 g Bismutnitrat wurden in 100 ml 20%iger Essigsäure gelöst und mit 20 ml 40%iger Kaliumiodidlösung gemischt.

Sprühlösung: 10 ml Stammlösung wurden mit 20 ml Eisessig und 100 ml Wasser verdünnt.

Zur Dünnschichtchromatographie von Lanolin wurden von Lanolin und den Vergleichssubstanzen Cholesterol, Lanosterol und Wollwachs jeweils einprozentige Lösungen in Diethylether hergestellt. Paraffin wurde in Chloroform gelöst. Die Lösungen wurden strichförmig auf die DC-Platten aufgetragen.

Zu Abb.4

Tab.4: R_f-Werte der Steroidester von Lanolin und ihre Färbungen mit Antimon(III)-chlorid

R_f-Werte	Färbungen
0,22	orange → rot → violett
0,31	grün → graublau
0,35	gelb → braun
0,45	blau
0,54	braun
0,55	orange → rot → violett
0,61	braun
0,69	gelb → braun
0,72	rot → violett
0,74	orange → rot → violett

Zur Dünnschichtchromatographie der Wollwachsalkoholsalbe wurden von der Salbe und von den Vergleichssubstanzen Cholesterol, Lanosterol, Wollwachsalkohol und Vaselin jeweils einprozentige Lösungen in Chloroform hergestellt. Es wurde strichförmig aufgetragen.

Für die Dünnschichtchromatographie der Hydrophilen Salbe wurde eine 1%ige Lösung der Salbe in Chloroform und eine 1%ige Lösung der Salbe in Ethanol hergestellt. Dies war erforderlich, weil sich nicht alle Komponenten der Salbe in einem Lösungsmittel lösten. Von den Vergleichssubstanzen Cetylstearylalkohol, Paraffin und Vaseline wurde ebenfalls eine 1%ige Lösung in Chloroform hergestellt,das cetylstearylschwefelsaure Natrium wurde in Ethanol gelöst.

Für die Dünnschichtchromatographie der Kühlsalbe wurden vom Erdnußöl, vom gelben Wachs, vom Walrat und von der Kühlsalbe selbst 1%ige Lösungen in Chloroform hergestellt. Die verschiedenen Komponenten der Kühlsalbe haben folgende R_f-Werte: 0,01, 0,02, 0,04, 0,05, 0,06, 0,22, 0,33, 0,40, 0,50, 0,56, 0,72.

Für die Dünnschichtchromatographie der Polyethylenglykolsalbe wurde jeweils eine 1%ige Lösung von PEG 300, PEG 1500 und von der PEG-Salbe in Methanol hergestellt.

Experimenteller Teil zur quantitativen Bestimmung von Salbengrundlagen durch HPLC

Geräte

Für die HPLC stand ein Flüssigkeitschromatograph hp 1010 A (identisch mit Hupe & Busch UFC 1000) zur Verfügung. Der Druck wurde durch eine Orlita Doppelkopfmembranpumpe DMP 1513/3 erzeugt. Die Membranpumpen bieten den Vorteil, daß die Teile, die mit dem Elutionsmittel in Berührung kommen, einfach aus indifferentem Material hergestellt werden können; meistens wird hochwertiger Stahl verwendet. Der Druck wird von einem durch Exzenter angetriebenen Kolben erzeugt und durch Hydrauliköl auf die Membran übertragen. Kugelventile geben beim Ansaugen und Ausstoßen der mobilen Phase den richtigen Weg frei.

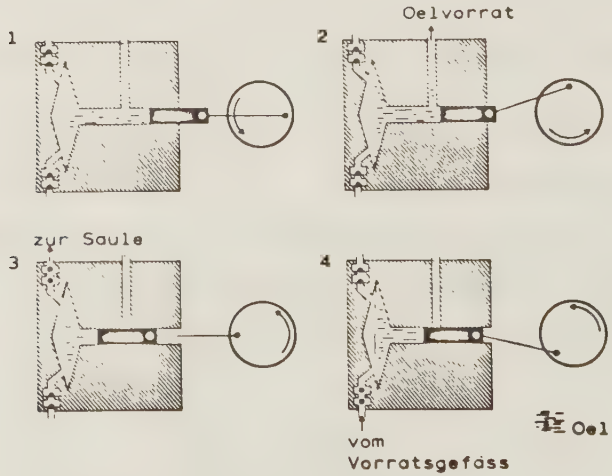


Abb.32: Membranpumpe (nach Hewlett-Packard)

Zur Integration der Peakflächen diente ein Integrator hp 3390 A, der direkt mit dem Detektor verbunden war.

Zur Detektion wurde ein Differential-Refraktometer hp 1031 A verwendet. Es wird auch als RI-Detektor bezeichnet, nach dem englischen "refractive index" für Brechnungsindex. Es wird die Differenz zwischen den Brechungsindices von mobiler Phase und Probe bestimmt; sie müssen sich deshalb genügend unterscheiden. RI-Detektoren sind etwa 1000 mal weniger empfindlich als UV-Detektoren (Nachweisgrenze unter günstigen Bedingungen etwa $5 \cdot 10^{-7}$ g Probe pro ml Eluat, im Gegensatz zu $5 \cdot 10^{-10}$ g/ml mit UV). Da der Brechungsindex temperaturabhängig ist, muß die Meßzelle thermostatisiert sein. Es gibt mehrere Möglichkeiten zur Brechungsindex-Detektion. Das Refraktometer, mit dem die quantitativen Messungen durchgeführt wurden, war ein Fresnel-Refraktometer. Es macht vom Fresnelschen Gesetz Gebrauch, wonach die an einer Phasengrenzfläche reflektierte Lichtmenge nicht nur vom Einfallswinkel, sondern auch von den Brechungsindices der beiden Medien, welche die Phasengrenze bilden, abhängig ist. Die mobile Phase fließt durch den engen Spalt zwischen Glasprisma und Metallblock, der zugleich den Wärmeaustausch bewirkt. Eine Teflonmanschette grenzt die Zelle ab. An der ersten Grenzfläche zwischen Prisma und Eluat wird ein Teil des Lichtes aus der Lampe reflektiert und geht verloren. Der Anteil des Lichts, welcher in die Flüssigkeit eintritt, wird an der zweiten Phasengrenzfläche Eluat-Metall reflektiert und vom Photowiderstand

aufgefangen. Die Referenzzelle ist analog aufgebaut. Verändert sich der Brechungsindex des Eluats in der Meßzelle, so ändert sich die Lichtintensität, welche den Photowiderstand erreicht; dieser registriert einen Helligkeitsunterschied, welcher von der Elektronik zu einem Signal verarbeitet wird.

Der Vorteil des Fresnel-Refraktometers ist sein kleines Zellvolumen von 5 µl. Die Zelle wird gut durchgespült und hat keine toten Winkel.

Es werden zwei Prismen angeboten, das eine zur Detektion mit Eluenten mit Brechungsindices zwischen 1,31 und 1,44, das andere für den Bereich 1,40 bis 1,55.

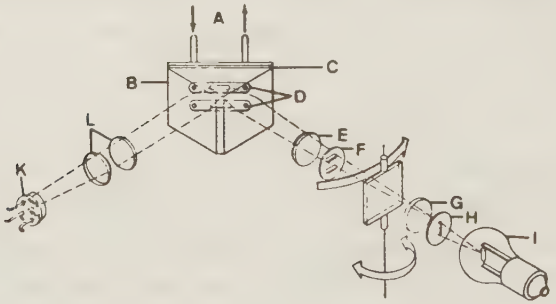


Abb.33: Strahlengang in einem Fresnel-Refraktometer

A = Proben- und Referenzzulauf
B = Prisma
C = Reflexionsschicht
D = Proben- und Referenzküvette
E-I = Lichtquelle
K = Photowiderstände
L = Linsen

Verwendete chromatographische Parameter

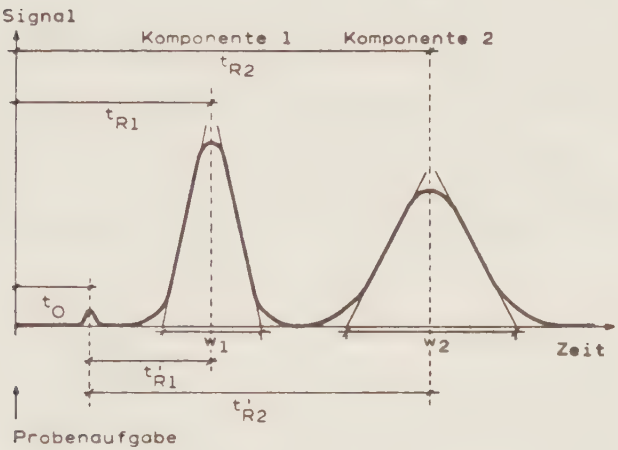


Abb.34: Das Chromatogramm und seine Kenngrößen

t_o : Totzeit der Trennsäule. Sie entspricht der Aufenthaltszeit der Substanzen in der mobilen Phase und ist für alle Stoffe gleich.

t_R : Gesamtretentionszeit der Substanzen. Sie setzt sich aus der Totzeit und der Nettoretentionszeit zusammen.

t'_R : Nettoretentionszeit, die die Aufenthaltszeiten der Substanzen in oder an der stationären Phase bezeichnet.

w : Basisbreite eines Peaks. Es handelt sich um die Strecke auf der Nullinie, die von den Wendetangenten begrenzt wird.

Die Auflösung R zweier benachbarter Peaks ist definiert durch den Quotienten aus dem Abstand der beiden Peakmaxima voneinander, d.h. der Differenz der beiden Retentionszeiten t_R, und dem arithmetischen Mittel aus den beiden Basisbreiten w.

$$R = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{w_1 + w_2}$$

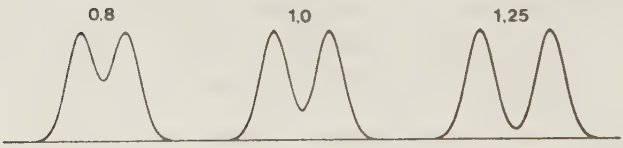


Abb.35: Auflösung benachbarter Peaks bei einem Peakhöhenverhältnis von 1:1

Bei einer Auflösung von 1 sind die Peaks nicht vollständig voneinander getrennt, doch erkennt man in jedem Fall zwei Komponenten. Die Wendetangenten berühren einander gerade und die Peakflächen überlappen sich zu 2%. Größere Auflösungen als 1,5 sind gar nicht erwünscht, weil die Analysenzeit verlängert wird, ohne irgend einen Gewinn an Information zu bringen. Die Auflösung ist auch von der Güte der Packung der Säule abhängig. Ein Maß dafür ist die Trennstufen- oder Bodenzahl N.

$$N = 16\left(\frac{t_R}{w}\right)^2$$

Testen der Säulen

Die gepackten Säulen wurden vor der Benutzung auf Trennstufenhöhe und Peaksymmetrie getestet.

Die Trennstufenhöhe wird aus dem Peak einer nicht retardierten Substanz berechnet. Als Testsubstanz wurde Benzol verwendet. Die Berechnung erfolgt aus der Länge der Säule und der Trennstufenzahl:

$$H = \frac{L}{N}$$

Die Peaksymmetrie T wird aus praktischen Gründen in einer Höhe von 10% der gesammten Peakhöhe bestimmt:

$$T = \frac{b_{0,1}}{a_{0,1}}$$

$a_{0,1}$ = Distanz von der Peakfront bis zum Maximum gemessen bei 0,1 h

$b_{0,1}$ = Distanz vom Maximum bis zum Peakende, gemessen bei 0,1 h.

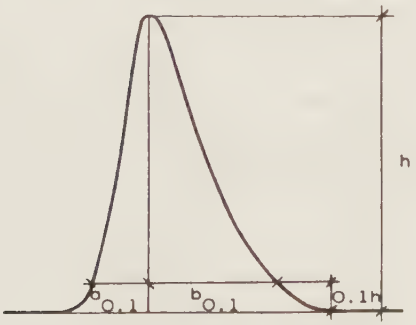


Abb.36: Asymmetrischer Peak

T sollte nicht größer als 2,5 sein. Überschreitet das Tailing einen Wert von 3, so wird die quantitative Flächenmessung fehlerhaft, weil der Punkt, wo der Peak wieder die Nullinie erreicht, schlecht erkennbar ist.

Arbeitsanweisung für die Bestimmung von Wollwachs in Lanolin und von Wollwachsalkoholen in der Wollwachsalkoholsalbe

Elutionsmittel

250 ml Diethylether, 250 ml Hexan und 5 ml Eisessig wurden gemischt und im Ultraschallbad entgast.

Detektor

In den RI-Detektor wurde das Prisma für Brechungsindices von 1,31 bis 1,44 eingebaut.
Gemessen wurde bei einer Empfindlichkeit von 8.

Integrator

Es wurde die Integrationsfunktion eingegeben, die die Basislinie an jedem Punkt des Chromatogramms setzt. Dies war erforderlich, weil ein Basisliniendrift während der Analyse auftrat.

Für die Eichgerade zur Bestimmung von Lanolin wurden sechs Wollwachslösungen verschiedener Konzentration in jeweils 10,0 g Ether hergestellt. Für jede Konzentration wurden drei Messungen durchgeführt und der Mittelwert berechnet.

Tab.5 zu Abb.16: Peakflächen der Cholesterlester von Wollwachslösungen verschiedener Konzentrationen

Wollwachs [g]	Peakfläche [FE]
0,220	0,540
0,360	0,877
0,500	1,369
0,650	1,800
0,740	1,979
0,840	2,297

Zur Überprüfung von Lanolin-Salbengrundlagen verschiedener Herkunft wurden jeweils 1 g Lanolin in 10,0 g Ether gelöst. Von jeder Salbe wurden 4 Messungen durchgeführt und jeweils der Mittelwert $\bar{x}$ und die Standardabweichung s berechnet.

Tab.6: Gehalt von Wollwachs in verschiedenen Lanolin-Salbengrundlagen
($\bar{x}$ = Mittelwert, s = Standardabweichung, VK = Variationskoeffizient, n = 4)

	$\bar{x}$ [g/100g]	s	VK [%]
Lanolin A	64,85	1,16	1,8
Lanolin B	65,39	0,98	1,5
Lanolin C	65,51	0,66	1,0
Lanolin D	64,43	1,03	1,6

Für die Eichgerade zur Bestimmung der Wollwachsalkoholsalbe wurden fünf Wollwachsalkohollösungen verschiedener Konzentration in jeweils 10,0 g Diethylether hergestellt. Jede Konzentration wurde dreimal gemessen und der Mittelwert berechnet.

Tab.7 zu Abb.18:
Peakflächen von Cholesterol aus Wollwachsalkohollösungen verschiedener Konzentration

Wollwachsalkohole [g]	Peakflächen [FE]
0,10	0,781
0,15	1,413
0,20	1,807
0,25	2,451
0,30	2,887

Zur Überprüfung verschiedener Wollwachsalkoholsalben wurden jeweils 2 g Salbe in 10,0 g Diethylether suspendiert.

Der hohe Gehalt an Vaselin erschwerte eine vollständige Lösung der Salbe in Ether. Chloroform wäre das optimale Lösungsmittel, aber es beeinflußte die Trennung der Wollwachsalkohole und damit die quantitative Bestimmung. Man ließ die Suspension ca. eine Stunde stehen bis sich das Vaselin abgesetzt hatte. Von der klaren Lösung wurden 20 µl zur Messung verwendet. Von vier verschiedenen Salben wurden jeweils vier Messungen durchgeführt.

Tab.8: Gehalt an Wollwachsalkoholen in verschiedenen Wollwachsalkoholsalben (n = 4)

	$\bar{x}$ [g/100g]	s	VK [%]
Wollwachsalkoholsalbe A	5,62	0,05	0,9
Wollwachsalkoholsalbe B	5,431	0,08	1,5
Wollwachsalkoholsalbe C	5,41	0,11	2,0
Wollwachsalkoholsalbe D	5,14	0,12	2,4

Arbeitsanweisung zur Bestimmung von Cetylstearylalkohol in der Hydrophilen Salbe

Elutionsmittel

400 ml Acetonitril und 100 ml Isopropanol wurden gemischt und 10 min im Ultraschallbad entgast.

Integrator

Es wurde die Integrationsfunktion gewählt, die beide Peaks (Cetyl- und Stearylalkohol) bestimmt und die Flächensumme ausdruckt.

Zur Erstellung der Eichgerade wurden die in Tabelle aufgeführten Konzentrationen an Cetylstearylalkohol in jeweils 10,0 g Diethylether hergestellt. Für jede Konzentration wurde drei Messungen durchgeführt und der Mittelwert berechnet.

Tab.9 zu Abb.20:
Peakflächen von Cetylstearylalkohol verschiedener Konzentration

Cetylstearylalkohol [g/10 g]	Peakfläche [FE]
0,10	3,248
0,20	6,846
0,26	9,589
0,30	10,271
0,40	13,359

Zur Bestimmung des Gehaltes an Cetylstearylalkohol in der Hydrophilen Salbe wurde eine Suspension von 1,0 g Salbe in 10,0 g Diethylether hergestellt. Von der über dem ungelösten Bestandteil stehenden klaren Lösung wurden 20 µl zur Messung entnommen. Es wurden jeweils vier Messungen von vier verschiedenen Salben durchgeführt.

Tab.10: Gehalt an Cetylstearylalkohol in verschiedenen Hydrophilen Salben (n = 4)

	$\bar{x}$ [g/100g]	s	VK [%]
Hydrophile Salbe A	26,42	0,05	0,2
Hydrophile Salbe B	26,46	0,10	0,4
Hydrophile Salbe C	26,62	0,02	0,1
Hydrophile Salbe D	26,70	0,05	0,2

Arbeitsanweisung zur Bestimmung von Erdnußöl in der Kühlsalbe

Elutionsmittel

Es wurden 350 ml Ethylacetat und 150 ml Acetonitril gemischt und 10 Minuten im Ultraschallbad entgast.

Integrator

Es wurde die Integrationsfuntkion gewählt, die die Basislinie an jeden Punkt des Chromatogramms setzt.

Für die Bestimmung der Eichgerade von Erdnußöl wurden vier Lösungen von Erdnußöl verschiedener Konzentration in jeweils 10 g Elutionsmittel hergestellt. Von jeder Konzentration wurden drei Messungen durchgeführt und der Mittelwert berechnet.

Tab.11 zu Abb.22:
Peakfläche von Erdnußöl verschiedener Konzentration

Erdnußöl [g/10 g]	Peakfläche [FE]
0,120	0,659
0,230	1,337
0,300	1,665
0,430	2,641

Zur Überprüfung des Gehalts an Erdnußöl in vier verschiedenen Kühlsalben wurden jeweils 0,5 g einer Salbe in 10,0 g Elutionsmittel suspendiert.
Die Suspensionen wurden zwei Minuten ins Ultraschallbad gestellt und anschließend 20 Minuten bei 4000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Von der klaren überstehenden Lösung wurden jeweils 20 µl für die Gehaltsbestimmung entnommen. Von vier verschiedenen Kühlsalben wurden jeweils vier Messungen durchgeführt und der Mittelwert $\bar{x}$ und die Standardabweichung s bestimmt.

Tab.12: Gehalt an Erdnußöl in verschiedenen Kühlsalben (n=4)

	$\bar{x}$ [g/100g]	s	VK [%]
Kühlsalbe A	60,39	0,30	0,5
Kühlsalbe B	60,47	0,30	0,5
Kühlsalbe C	59,46	0,36	0,6
Kühlsalbe D	59,24	0,29	0,5

Arbeitsanweisung zur Bestimmung der Polyethylenglykolsalbe

Als Elutionsmittel wurden 325 ml Methanol und 175 ml Wasser gemischt und ca. 15 Minuten entgast.
Es wurden 0,1 g PEG 300 und 0,1 g PEG 1500 in jeweils 10,0 g Elutionsmittel gelöst. Außerdem wurden von vier PEG-Salben verschiedener Herkunft jeweils 0,2 g Salbe in 10,0 g Elutionsmittel gelöst. Zur Messung wurden jeweils 20 µl dieser Lösungen auf die Säule gegeben.

Tab.13: Peakflächen der Polyethylenglykole 300 und 1500 von verschiedenen PEG-Salben

	PEG 300 [FE]	PEG 1500 [FE]
PEG 300	5,250	-
PEG 1500	-	6,059
PEG-Salbe A	5,268	5,993
PEG-Salbe B	5,357	6,102
PEG-Salbe C	5,282	6,037
PEG-Salbe D	5,334	6,069

Arbeitsanweisung zur Bestimmung der Zinksalbe

Zur Überprüfung von verschiedenen Zinksalben auf ihren Gehalt an Wollwachsalkoholen wurden jeweils 2,0 g Salbe in 10,0 g Diethylether suspendiert. Anschließend zentrifugierte man die Suspension 20 Minuten bei 4000 Umdrehungen/min. Von der klaren Lösung wurden 20 µl auf die Säule gegeben. In Tab.14 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 4 Messungen bei vier verschiedenen Salben aufgeführt.

Tab.14: Gehalt an Wollwachsalkoholen in verschiedenen Zinksalben (n = 4)

	$\bar{x}$ [g/100 g]	s	VK [%]
Zinksalbe A	5,11	0,07	1,4
Zinksalbe B	4,97	0,09	1,9
Zinksalbe C	4,76	0,19	4,0
Zinksalbe D	4,69	0,09	2,0

Erläuterung der Verfahren zur Isolierung von Arzneistoffen aus den Salbengrundlagen des DAB 8

Für die Entwicklung eines Analysenganges zur Isolierung von Arzneistoffen aus Salbengrundlagen wurden zunächst nach den Vorschriften des DAB 8 die Wollwachsalkoholsalbe, die Hydrophile Salbe, die PEG-Salbe, die Zinksalbe, die Zinkpaste und Lanolin hergestellt. In jede Salbengrundlage wurden sämtliche Substanzen der Tabellen 1 und 2 jeweils als Dreierkombination eingearbeitet. Als Beweis für die Isolierung einer Substanz aus der Salbe wurde ein Dünnschichtchromatogramm angefertigt. Es wurden DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F_{254} verwendet.

Beschreibung des Analysenganges zur Isolierung von Arzneisubstanzen aus der Wollwachsalkoholsalbe, der Hydrophilen Salbe, der Kühlsalbe und aus Lanolin.

1 g Salbe wurde mit 30 ml Petrolether unter Erwärmen auf dem Wasserbad gelöst. Man dekantierte die Lösung von Substanzen, die in Petrolether unlöslich sind, ab. Hierzu gehörten Sulfonamide, hydrophile Säuren und quartäre N-Verbindungen. Sie konnten dünnschichtchromatographisch mit Toluol + Ethanol + Essigsäure = 50 + 40 + 10 getrennt und identifiziert werden.

Um saure Substanzen zu isolieren, wurde die Petrolether-lösung dreimal mit je 10 ml 3N-Natronlauge ausgeschüttelt. Die Carbonsäuren, Phenole und Ureide gingen unter Salzbildung in die wäßrige Phase. Diese wurde mit 25 ml 3N-Schwefelsäure angesäuert und dreimal mit je 20 ml Ether und einmal mit 10 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde auf die Hälfte eingeengt und dünnschichtchromatographisch mit Toluol + Isopropanol + Ammoniak (25%) = 30 + 60 + 10 untersucht. Die alkalischen Substanzen waren in der Petroletherphase gelöst. Sie wurde zuerst dreimal mit jeweils 10 ml Wasser, dann dreimal mit je 10 ml 3N-Schwefelsäure ausgeschüttelt. Zu der wäßrigen Phase, in der die Basen als Salze vorlagen, gab man 25 ml 3N-Natronlauge und schüttelte dreimal mit je 20 ml Ether und einmal mit 10 ml Chloroform aus. Die organische Phase wurde auf die Hälfte eingedampft und wieder dünnschichtchromatographisch untersucht. Als Fließmittel wurde Chloroform + Diethylamin = 90 + 10 verwendet.

Nach der Abtrennung der sauren und alkalischen Substanzen konnten sich noch Neutralstoffe in der Petroletherphase befinden. Die Petroletherlösung wurde auf 10 ml eingeengt und ca. 5 µl davon wurden direkt auf die DC-Platte aufgetragen. Als Fließmittel wurde Chloroform + Ethanol= 95 + 5 verwendet.

Die meisten Substanzen ließen sich mit UV_{254} oder UV_{366} detektieren. Zur Sichtbarmachung von Substanzen die nicht oder nur schwach im UV-Licht zu sehen waren, wurden Sprühreagenzien verwendet. Als Universalreagens wurde eine schwefelsaure Kaliumpermanganat-Lösung verwendet: 0,5 g $KMnO_4$ wurden in 15 ml konzentrierter Schwefelsäure gelöst.

Zur Detektion von Alkaloiden und anderen N-haltigen Verbindungen eignete sich Dragendorffs Reagens (s.S.76) oder eine Kaliumiodplatinat-Lösung: 1,0 ml einer 10%igen Hexachloroplatinsäure-Lösung wurden mit 20,0 ml einer 10%igen Kaliumiodid-Lösung und mit 40 ml Wasser gemischt.

Amine wurden mit Ehrlichs Reagens besprüht: 1,0 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd wurde in einem Gemisch aus 25 ml 35%iger Salzsäure und 75 ml Methanol gelöst.

Phenole detektierte man mit einer einprozentigen wäßrigen Eisen(III)-chlorid-Lösung.

Beschreibung des Analysenganges zur Isolierung von Arzneisubstanzen aus der PEG-Salbe

Man löste 1 g Salbe in 20 ml Wasser. Nicht gelöste Substanzen wurden durch Dekantieren oder Filtrieren abgetrennt. Sie konnten durch den modifizierten Stas-Otto-Gang[34)]

getrennt und anschließend dünnschichtchromatographisch identifiziert werden.

In der wäßrigen Lösung waren vor allem Salze basischer Substanzen gelöst. Um sie zu isolieren versetzte man die Lösung mit 15 ml 3N-Natronlauge und schüttelte dreimal mit je 20 ml Ether aus. Die Etherphase wurde auf die Hälfte eingedampft und dünnschichtchromatographisch mit Chloroform + Diethylamin = 90 + 10 untersucht. Zur Isolierung saurer Substanzen wurde die wäßrige Phase mit 15 ml 3N-Schwefelsäure angesäuert und anschließend dreimal mit je 20 ml Ether ausgeschüttelt. Die Etherphase wurde auf die Hälfte eingeengt und ca. 5 µl wurden auf die DC-Platte aufgetragen. Mit Toluol + Isopropanol + Ammoniak = 30 + 60 + 10 wurde entwickelt.

Beschreibung der Isolierung von Arzneistoffen aus der Zinksalbe und der Zinkpaste

Ca. 2 g Salbe wurden in 25 ml Wasser durch Umrühren und Erwärmen auf dem Wasserbad suspendiert. Nach dem Abkühlen wurden 20 ml der Suspension auf eine Extrelut-Säule gegeben. Die Säule war mit weitporigem Kieselgur von körniger Struktur und hohem Porenvolumen gefüllt. Am oberen Ende wurde die Säule durch einen eingesetzten Korb mit einer Filterplatte, am unteren Ende durch ein

Filterplättchen abgeschlossen. Die Elutionsgeschwindigkeit wurde durch eine auf dem Auslaufkonus gesteckte Kanüle reguliert (s.Abb.37). Man ließ die wäßrige Probe 15 Minuten als stationäre Phase auf der porösen Matrix. Dann wurden 40 ml Ethanol auf die Säule gegeben. Innerhalb von 10-25 min. wurde die Wollwachsalkoholsalbe mit den Arzneistoffen eluiert. Das ZnO blieb auf der Säule. Das Eluat wurde eingedampft und der Analysengang wie auf Seite 93 beschrieben angewendet, um die Arzneistoffe abzutrennen.

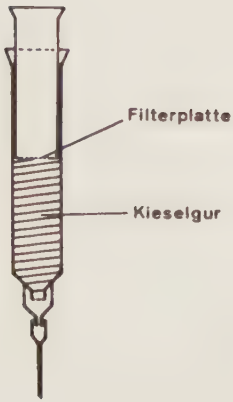


Abb.37: Extrelut^{R}-Säule

Arbeitsanweisung zur Dünnschichtchromatographie der Emulgatoren des Deutschen und Europäischen Arzneibuches

Die Emulgatoren wurden auf den DC-Platten, die auf Seite 74 beschrieben sind, chromatographiert.
Die organischen Lösungs- bzw. Fließmittel entsprachen den Reinheitsforderungen der Arzneibücher.
Es wurde in Normalkammern bei Kammersättigung chromatographiert.

Von den Emulgatoren wurden jeweils einprozentige Lösungen hergestellt.
Glycerolmonostearat wurde in Chloroform gelöst; Polysorbat 20, 60, 80 und PEG-400-stearat wurden in Methanol gelöst.

Sprühreagenzien

2,7-Dichlorfluorescein-Lösung:

0,1 g 2,7-Dichlorfluorescein werden in 100 ml Ethanol (96%) gelöst.

Dragendorffs Reagens mit Bariumchlorid:

Lösung A: 1,7 g Bismutnitrat werden in 20 ml Eisessig und 80 ml Wasser gelöst.

Lösung B: Man löst 4,0 g KI in 100 ml Wasser.

Lösung C: Man mischt A und B, fügt 200 ml Eisessig hinzu und füllt mit Wasser auf 1000 ml auf.

Sprühlösung: 2 Teile Lösung C + 1 Teil 20%ige Bariumchloridlösung.

Arbeitsanweisung zur quantitativen Bestimmung der Monoglyceride im Glycerolmonostearat

Elutionsmittel

450 ml Chloroform und 50 ml Methanol wurden gemischt und im Ultraschallbad entgast.

Zur Bestimmung des Monoglyceridgehaltes wurden viermal 0,1 g Glycerolmonostearat abgewogen. Zu drei wurden 0,05 g, 0,10 g und 0,15 g reines Glycerolmonostearat zugegeben. Man füllte alle vier mit dem Elutionsmittelgemisch auf 10,00 g auf. 20 µl jeder Lösung wurden auf die Säule gegeben.

Tab.15: Flächen des Monoglyceridpeaks von Glycerolmonostearat-Lösungen nach Zusatz von verschiedenen Mengen reinen Glycerolmonostearats (n = 4)

	$\bar{x}$ [FE]	s	VK [%]
-	0,341	0,01	2,9
0,1	1,474	0,08	5,4
0,15	1,897	0,05	2,6

VIII. Literaturverzeichnis

1) B.de Vries und G.Jurriens, Fette, Seifen, Anstrichm. 65, 725(1963)

2) L.Morris, J.Lipid Res. 4, 357(1963) und 7, 717(1966)

3) C.B.Barrett, M.S.Dallas und F.Padley, J.Amer.Oil Chemists'Soc. 40, 580(1963)

4) H.P.Kaufmann und H.Wessels, Fette, Seifen, Anstrichm. 66, 13,81(1964)

5) O.M.Young und I.N.Kaufer, J.Chrom.(Amsterdam) 19, 611(1965)

6) H.P.Kaufman, Z.Makus und B.Das, Fette, Seifen, Anstrichm. 63, 807(1961)

7) DFG-Einheitsmethoden, Wissenschaftl.Verlagsges. Stuttgart 1981

8) M.Streibl und K.Stránský, Fette, Seifen, Anstrichm. 72, 856(1970)

9) O.Podlaha, B.Töregard und B.Petterson, Fette, Seifen, Anstrichm. 82, 320(1980)

10) M.Streibl, J.Irousova und K.Stránský, Fette, Seifen, Anstrickm. 73, 301(1971)

11) H.P.Kaufmann, Fette, Seifen, Anstrichm. 72, 902(1970)

12) H.Wessels und N.Rajagopal, Fette, Seifen, Anstrichm. 72, 993(1970)

13) E.Stahl, Dünnschichtchromatographie, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1967, S.387

14) J.Ripphahn und H.Halpaap, J.Chromatogr. 112, 81(1975)

15) J.Ripphahn und H.Halpaap, Merck-Kontakte, 1976 (3), 16

16) A.Zlatkis und R.Kaiser, HPTLC - High Performance Thin-Layer Chromatography, J.Chromatogr.Library 9, Elsevier Publishing Co., Amsterdam, New York, 1977

17) J.Ripphahn und H.Halpaap, Chromatographia 10, 613(1977)

18) Lit.[17], S.643

19) H.Janecke, Dtsch.Apoth.-Ztg. 95, 79 und 376(1955)

20) C.H.Brieskorn und H.Hofmann, Arch.Pharm. 292, 484(1959)

21) R.Voigt, Lehrbuch der pharmazeut.Technologie, VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, 1975, S.287

22) C.Lüdecke in Kaufmann, Untersuchung von Fetten und Fettprodukten, Springer-Verlag Berlin, 1958, S.1006

23) H.P.Kaufmann, Fette, Seifen, Anstrichm. 65, 398(1963)

24) Katalog pharmazeut. Hilfsstoffe, Copyright by Ciba-Geigy, Hoffmann-La Roche und Sandoz, Basel 1974, Vertrieb APV-Mainz

25) G.Haberland, Mitt.Dtsch.Pharm.Ges. 24, 142(1954)

26) K.Thoma, R.Rombach und E.Ullmann, Scientia pharmac. 32, 216

27) K.Thoma, R.Rombach und E.Ullmann, Arch.Pharm. 298, 19(1965)

28) F.Geiss, Parameter der Dünnschichtchromatographie, Verlag Vieweg & Sohn, Braunschweig, 1972, S.2

29) Lit.[13], S.133

30) H.Engelhardt, Hochdruckflüssigkeitschromatographie, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1975 S.197

31) R.Kaiser und R.Rieder, J.Chromatogr. 142, 411(1977)

32) Lit.[28] S.349

33) H.Sucker und J.Dietrich, Pharm.Ind. 34, 15, 117, 190, 345, 430(1972)

34) H.Auterhoff und K.-A.Kovar, Identifizierung von Arzneistoffen, 4.Aufl., Wissenschaftl.Verlagsges. Stuttgart, 1981, S.26

35) H.P.Fiedler, Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und angewandte Gebiete, Editio Cantor KG, Aulendorf/Württ., 1971, S.247

36) Lit.[21] S.375

37) R.Neissner, Pharm.Ind. 31, 724(1969)

38) E.Merck, Anfärbereagenzien für die Papier- und Dünnschichtchromatographie, Darmstadt, 1970

39) P.Berndt und J.Richter, Pharmazie 20, 359(1965)

Inhaltsverzeichnis

Seite

I. Einleitung..... 1

II. Qualitative Bestimmung der Salbengrundlagen durch Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie..... 4

1. Lanolin..... 10
2. Wollwachsalkoholsalbe..... 15
3. Hydrophile Salbe..... 19
4. Kühlsalbe..... 23
5. PEG-Salbe..... 27
6. Zinkpaste..... 31
7. Zinksalbe..... 31

III. Quantitative Bestimmung der Salbengrundlagen durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie..... 33

Quantitative Auswertung eines Hochdruckflüssigkeits-chromatogramms..... 35

Übertragung der Trennbedingungen von der DC auf die HPLC..... 37

1. Bestimmung von Wollwachs im Lanolin..... 38
2. Bestimmung der Wollwachsalkohole in der Wollwachs-alkoholsalbe..... 41
3. Bestimmung von Cetylstearylalkohol in der Hydro-phile Salbe..... 44
4. Bestimmung von Erdnußöl in der Kühlsalbe..... 47
5. Bestimmung der PEGe in der PEG-Salbe..... 49
6. Bestimmung der Wollwachsalkohole in der Zinksalbe 51

Seite

IV. Abtrennung der Arzneistoffe von der Salbengrundlage..... 52
1. Isolierung der Arzneistoffe aus der Wollwachsalkoholsalbe, der Hydrophilen Salbe, der Kühlsalbe und aus Lanolin..... 54
2. Isolierung der Arzneistoffe aus der PEG-Salbe.. 56
3. Isolierung der Arzneistoffe aus der Zinksalbe und aus der Zinkpaste..... 57

V. Chromatographische Bestimmung der Emulgatoren des Arzneibuches..... 58
1. Glycerolmonostearat..... 58
1.1 DC und RP-DC von Glycerolmonostearat..... 60
1.2 Quantitative Bestimmung der Monoglyceride durch HPLC..... 63
2. Polyethylenglykol-Sorbitanfettsäureester..... 65
2.1 HPTLC von Polysorbat 20 und 60..... 67
2.2 HPTLC von Polysorbat 80..... 68
3. HPTLV von PEG-400-stearat..... 70

VI. Zusammenfassung..... 71

VII. Experimenteller Teil..... 74

VIII. Literaturverzeichnis..... 100

Lebenslauf

Name	Helga Langlouis
Geburtstag	29.3.1956
Geburtsort	Ulm
Eltern	Erwin Langlouis, Landwirt und Justine Langlouis, geb. Laib
Schulischer Werdegang	
Grundschule	Hauptschule Bußmannshausen April 1963 bis November 1966
Gymnasium	Gymnasium Laupheim Dezember 1966 bis Mai 1975
Reifeprüfung	22.Mai 1975
Beruflicher Werdegang	
Studium der Pharmazie	Universität Tübingen Oktober 1975 bis März 1979
1.Abschnitt der Pharmazeut.Prüfung	8.September 1977
2.Abschnitt der Pharmazeut.Prüfung	20.März 1979
3.Abschnitt der Pharmazeut.Prüfung	23.April 1980
Pharmazeut.Praktikum	Weißkreuz-Apotheke, Biberach April 1979 bis September 1979
Beginn der vorliegenden Arbeit	Oktober 1979
Abschluß der Arbeit	September 1982
Wiss. Hilfskraft	Oktober 1979 bis November 1980
Wiss. Angestellte	seit Dezember 1980

Meine akademischen Lehrer außer Herrn Prof.Dr.K.-A.Kovar waren die Professoren und Dozenten:

H.Auterhoff, J.Schultz	(Pharmazeutische Chemie)
E.Graf	(Pharmazeutische Technologie)
H.P.T.Ammon	(Pharmakologie)
E.Reinhard	(Pharmakognosie)
R.E.Bader	(Hygiene)

D. GRÄBNER
DISSERTATIONS U. OFFSETDRUCKEREI

Gotenstraße 3
8602 Altendorf bei Bamberg
Telefon: 09545/8791